



INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

CARACTERIZAÇÃO DE REVESTIMENTOS DE NITRETO DE TITÂNIO PARA IMPLANTES DENTÁRIOS E ADITAMENTOS PROTÉTICOS

Trabalho submetido por
Patrícia Domingues Prior Neves
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

outubro de 2017



INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

CARACTERIZAÇÃO DE REVESTIMENTOS DE NITRETO DE TITÂNIO PARA IMPLANTES DENTÁRIOS E ADITAMENTOS PROTÉTICOS

Trabalho submetido por
Patrícia Domingues Prior Neves
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Trabalho orientado por
Professor Doutor Hélder José Nunes da Costa
e coorientado por
Professor Doutor Paulo Rogério Figueiredo Maia

outubro de 2017

*"A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar
o que ainda ninguém pensou sobre aquilo que toda a gente viu."*

Arthur Schopenhauer

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, por acreditarem sempre em mim, por todo o apoio incondicional e todos os ensinamentos e valores que me transmitiram. Por serem os meus pilares e a minha grande força e me permitirem seguir o meu sonho apesar de ter seguido uma área bem diferente da praticada pela família em geral. Que este trabalho seja o início de um grande projeto que juntos poderemos vir a desenvolver.

À minha irmã Inês, pela enorme amizade e compreensão.

Ao meu Noivo, pelo carinho e paciência infinita e pela transmissão de confiança e de força, em todos os momentos.

A eles, dedico todo este trabalho e espero que o culminar desta etapa, possa, de alguma forma, retribuir e compensar toda a dedicação, carinho e apoio.

AGRADECIMENTOS

Esta secção não me permite agradecer, como devia, a todas as pessoas que, ao longo do meu Projeto Final do Mestrado Integrado em Medicina Dentária me ajudaram, direta ou indiretamente, a cumprir os meus objetivos e a realizar mais esta etapa da minha formação académica. No entanto, não posso deixar de mencionar algumas pessoas, sem as quais este projeto não seria possível.

Ao meu Orientador Professor Doutor Hélder Costa e ao meu Co-Orientador Professor Doutor Paulo Maia do Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz (ISCSEM), pela confiança e apoio que depositaram em mim, pela permanente disponibilidade, dedicação, paciência, incentivo e conhecimento transmitido ao longo deste trabalho.

Ao meu Co-Orientador Professor Doutor Pedro Graça do I3N da Universidade de Aveiro pela disponibilidade e apoio dado a este projeto.

Ao meu Co-Orientador Professor Doutor João Borges da FCT/Universidade Nova de Lisboa pela disponibilidade e apoio no desenvolvimento de vários ensaios.

À Co-Orientadora Engenheira Alice Marciel da Empresa/Departamento de Engenharia de Materiais da Universidade de Aveiro por contribuir imensamente com comentários, pesquisa de artigos, sugestões, realização de ensaios e críticas positivas.

Ao Professor Jorge Silva, da FCT/Universidade Nova de Lisboa, pela disponibilidade, contributo nos testes biológicos e auxílio na interpretação de resultados.

Às Universidades envolvidas, Universidade de Aveiro, Faculdade de Ciências e Tecnologias (FCT)/Universidade Nova de Lisboa e em especial ao Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz por permitirem a realização deste projeto.

À empresa *Privev* e a todos os colaboradores, pelo revestimento das amostras.

Aos meus amigos Diogo, Filipa, Francisco, Madalena e Rute que conheci neste percurso académico, por toda a amizade e momentos que partilhámos.

Aos meus Familiares e Noivo, pelos ensinamentos e por serem a razão da minha perseverança e coragem.

A todos, muito obrigada!

RESUMO

Introdução: O titânio é conhecido pelas excelentes características como biocompatibilidade, resistência à corrosão, baixa citotoxicidade e por potencializar a osteointegração, sendo o biomaterial de eleição para implantes dentários. Apesar das distintas características têm sido mencionadas algumas limitações. Neste contexto, o nitreto de titânio afigura-se um substituto promissor, respondendo com melhorias estéticas, biomecânicas, promovendo o crescimento celular e reduzindo a adesão bacteriana.

Objetivos: Caracterização da superfície de implantes e aditamentos protéticos, revestidos com nitreto de titânio, do ponto de vista mecânico, químico e biológico; comparação com a superfície de implantes revestidos a titânio.

Materiais e Métodos: Comparação e análise de dois implantes e dois aditamentos protéticos de cada revestimento (nitreto de titânio e multicamada de zircônio, carbonitreto de zircônio e nitreto de titânio), depositados pelo método PVD. Adicionalmente, a mesma metodologia foi aplicada e comparada em amostras comerciais. A caracterização da superfície envolveu os seguintes testes: difração de raio-X; perfilometria ótica; microscopia eletrônica de varrimento com espectrometria de energia dispersiva de raio-X; teste de *pull-off*; teste de citotoxicidade, teste de adesão e proliferação celular; teste da fosfatase alcalina e imunofluorescência.

Resultados: Os implantes com revestimento de nitreto de titânio apresentam melhores características mecânicas, químicas e principalmente biológicas; a adesão dos revestimentos em estudo não revela destacamento do substrato quando aplicada uma força inferior a 2,8 MPa; a porosidade inerente ao substrato é considerada controlada e reprodutível; o filme de nitreto de titânio revela elevada capacidade de adesão e proliferação celular, tal como ausência de citotoxicidade celular; a morfologia das células não é afetada e há evidências de atividade metabólica indutora de mineralização.

Conclusão: O revestimento nitreto de titânio abre perspectivas futuras em relação a substratos metálicos diferentes de titânio na área da Medicina Dentária.

Palavras-Chave: implantes; nitreto de titânio; revestimento; PVD.

ABSTRACT

Introduction: Titanium as a coating material distinguishes itself by its above average biocompatibility, resistance to corrosion, low cytotoxicity and for better enhancing osseointegration, being therefore the biomaterial of choice for this purpose. Despite the different characteristics, some limitations were mentioned. As such, titanium nitride has been suggested as a solution for these limitations, by improving aesthetics and biomechanical properties of titanium, as well as by boosting cell growth and reducing bacterial adhesion.

Objectives: Characterization of the implants and prosthetic devices' surface, coated with titanium nitride, from a mechanical, chemical and biological perspective; comparison of the latter with titanium coated implants.

Materials and Methods: Comparison and analysis of two implants and two prosthetic devices, one of each coated with the titanium nitride compound, and the remaining coated with a multilayer composed of zirconium, zirconium carbonitride and titanium nitride (deposited by the PVD method). Additionally, the same methodology was applied by benchmarking the sample against commercially available equivalents. The surface characterization involved the following tests: X-ray diffraction; optical profilometry; scanning electron microscopy with X-ray dispersive energy spectrometry; pull-off test; cytotoxicity test, adhesion test and cell proliferation; alkaline phosphatase test and immunofluorescence.

Results: Implants with titanium nitride coating displayed better mechanical, chemical, and biological characteristics; coatings' adhesion studied did not displayed signs of substrate detachment when forces of less than 2.8 MPa were applied; substrate's porosity is considered controlled and reproducible; titanium nitride film shows high levels of cellular adhesion and proliferation with no cytotoxicity; cell's morphology was not affected and it was found evidence of metabolic activity inducing mineralization.

Conclusion: Titanium nitride exhibits high potential among the metallic substrates, other than titanium, for applications in the field of Dentistry.

Keywords: implants; titanium nitride; coating; PVD.

ÍNDICE GERAL

I.	INTRODUÇÃO	13
II.	ESTADO DE ARTE	15
2.1.	EDENTULISMO	15
2.1.1.	REABILITAÇÃO ORAL DE ESPAÇOS EDÊNTULOS	16
2.2.	IMPLANTOLOGIA	18
2.2.1.	IMPLANTE	19
2.4.	BIOCOMPATIBILIDADE.....	22
2.4.1.	CITOTOXICIDADE	23
2.5.	MATERIAIS BIOCAMPATÍVEIS.....	24
2.5.1.	MATERIAS USADOS EM IMPLANTOLOGIA.....	24
2.5.1.1.	TITÂNIO.....	26
2.6.	REVESTIMENTO E TRATAMENTO DE SUPERFÍCIE	27
2.6.1.	NITRETO DE TITÂNIO.....	29
III.	OBJETIVOS	31
IV.	HIPÓTESES.....	32
V.	MATERIAIS E MÉTODOS	35
5.1.	TIPO DE ESTUDO	35
5.2.	LOCAL DE REALIZAÇÃO DO PROJETO	35
5.3.	APROVAÇÃO E CONDIÇÕES	35
5.4.	AMOSTRAS	35
5.5.	MATERIAIS	37
5.6.	METODOLOGIA.....	37
5.6.1.	PROCESSO DE DEPOSIÇÃO DO FILME	37
5.6.2.	MÉTODOS DE ANÁLISE DE SUPERFÍCIE.....	42
5.6.2.1.	DIFRAÇÃO DE RAO X (DRX)	42
5.6.2.2.	PERFILOMETRIA ÓTICA 3D	43

5.6.2.3. MICROCOPIA ELETRÔNICA DE VARRIMENTO (SEM).....	44
5.6.2.4. ESPECTROSCOPIA DE RAIO-X POR DISPERSÃO DE ENERGIA (EDXS).....	45
5.6.3. TESTES MECÂNICOS	45
5.6.3.1. TESTE DE “PULL-OFF” – ADESÃO	45
5.6.4. TESTES BIOLÓGICOS	47
5.6.4.1. TESTE DE CITOTOXICIDADE.....	48
5.6.4.2. ADESÃO E PROLIFERAÇÃO CELULAR	50
5.6.4.3. FOSFATASE ALCALINA	53
4.5.1.1. ANÁLISE DA MORFOLOGIA – IMUNOFLUORESCÊNCIA	54
VI. RESULTADOS	59
6.1. ANÁLISE DA SUPERFÍCIE	59
6.2. TESTES BIOLÓGICOS	72
6.2.1. TESTE DE CITOTOXICIDADE	72
6.2.2. ADESÃO E PROLIFERAÇÃO CELULAR	72
6.2.3. FOSFATASE ALCALINA – ALP	74
6.2.4. ANÁLISE DA MORFOLOGIA – IMUNOFLUORESCÊNCIA.....	75
VII. DISCUSSÃO	79
VIII. CONCLUSÃO.....	85
IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87

ÍNDICE FIGURAS

Figura 1: Barómetro Nacional de Saúde Oral, em resposta à pergunta: Q2.	16
Figura 2: Barómetro Nacional de Saúde Oral, em resposta à pergunta: Q2.1.	17
Figura 3: Diferentes tipos de desenho do corpo do implante da categoria de implantes de “forma radicular”	19
Figura 4: Classificação dos tipos de osso preconizada por Mish.	22
Figura 5: Fotografia de uma mandíbula que data 600 a.C.	25
Figura 6: Ilustração do processo de PVD.	37
Figura 7: Ilustração do processo de deposição por arco catódico.	39
Figura 8: Máquinas usadas no processo de revestimento das amostras.	39
Figura 9: Ilustração da difração de raios-X.	43
Figura 10: a) Princípio de geração do feixe de eletrões num sistema SEM; b) Interação do feixe de eletrões com a matéria.	45
Figura 11: Esquematização do princípio de funcionamento do equipamento usado para determinar a adesão dos filmes de TiN.	46
Figura 12: Esquematização representativa da análise visual do tipo de fratura no teste de adesão.	47
Figura 13: Câmara de <i>Neubauer</i> para contagem de células.	49
Figura 14: Leitor de microplacas usado na leitura da absorvância.	50
Figura 15: Redução da resazurina a resorufina.	52
Figura 16: Espetros de absorvância da resazurina e da resorufina.	53
Figura 17: Especificações do filtro de excitação ultravioleta UV-2E/C e respectivos comprimentos de onda.	56

Figura 18: Micrografias dos implantes e dos aditamentos protéticos com ampliação de 25 x: monocamada de TiN (1), multicamada Zr/ZrCN/TiN (2) e comercial (3).....	59
Figura 19: Mapeamento de EDXS dos implantes e aditamentos protéticos: monocamada de TiN (1), multicamada Zr/ZrCN/TiN (2) e comercial (3).	60
Figura 20: Espetro de difração raio-X por ângulo rasante dos filmes TiN e Zr/ZrCN/TiN, depositados num substrato de silício.	62
Figura 21: Micrografias dos filmes depositados. a) TiN e b) Zr/ZrCN/TiN, depositados num substrato de silício.	63
Figura 22: Micrografias do filme de TiN a duas ampliações 1 kx e 10 kx, depositados num substrato de silício.	63
Figura 23: Micrografias do filme de Zr/ZrCN/TiN a 10 kx, depositado num substrato de silício.	64
Figura 24: Mapeamento de EDXS e respetiva indexação elementar do filme de TiN, depositado num substrato de silício.....	64
Figura 25: Mapeamento de EDXS e respetiva indexação elementar do filme de Zr/ZrCN/TiN, depositado num substrato de silício.	65
Figura 26: Mapeamento de EDXS e respetiva indexação elementar dos implantes HI-TEC Implants® sem deposição, com deposição de TiN e com deposição de Zr/ZrCN/TiN.	66
Figura 27: Mapeamento de EDXS e respetiva indexação elementar do implantes HI-TEC Implants® com deposição de TiN e do implante Exaktus® Cilíndricos Biodent HEX RP comercial.	67
Figura 28: Resultados da Perfilometria referentes às amostras do implante HI-TEC Implants® com revestimento de TiN, do implante HI-TEC Implants® com o revestimento de Zr/ZrCN/TiN e do implante Exaktus® Cilíndricos Biodent HEX RP comercial.	68
Figura 29: Resultados da Perfilometria referentes às amostras do silício com revestimento de TiN.	69

Figura 30: Resultados da Perfilometria referentes às amostras do silício com revestimento de Zr/ZrCN/TiN.	69
Figura 31: Resultados obtidos no teste de adesão para o revestimento de TiN (à direita) e Zr/ZrCN/TiN (à esquerda).	70
Figura 32: Esquematização gráfica dos resultados obtidos no teste de adesão e proliferação celular.	73
Figura 33: Resultados obtidos no teste ALP para as amostras de TiN.	74
Figura 34: Resultados obtidos no teste ALP para as amostras de Zr/ZrCN/TiN.	75
Figura 35: Resultados da marcação da imunofluorescência para o filme de TiN.	76
Figura 36: Resultados da marcação da imunofluorescência para o revestimento de Zr/ZrCN/TiN.	77
Figura 37: Resultados da marcação da imunofluorescência para a amostra de controlo.	78

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Tabela descritiva das amostras usadas no projeto.....	36
Tabela 2: Parâmetros de deposição do revestimento com TiN.....	41
Tabela 3: Parâmetros de deposição do revestimento com Multicamadas Zr/ZrCN/TiN.	41
Tabela 4: Especificações dos anticorpos e marcadores utilizados.....	57
Tabela 5: Resultados de viabilidade celular relativa ao controlo negativo obtidos no teste de citotoxicidade para os revestimentos em estudo.	72
Tabela 6: Resultados do teste de Adesão e Proliferação Celular para as amostras de TiN, Zr/ZrCN/TiN, Controlo celular e, respetivos desvios padrão.	73

LISTA DE ABREVIATURAS

ABS - Acrilonitrila Butadieno Estireno

ALP - Fosfatase Alcalina

BNSO - Barómetro Nacional de Saúde Oral

BSA - Albumina de Soro Bovino

C - Carbono

DMF - Naftol AS-MX Fosfato/N,N Dimetilformamida

DMSO - Dimetilsulfóxido

DRX - Difração de raios-X

EDXS - Espectroscopia de raio-X por Dispersão de Energia

FCT - Faculdade de Ciências e Tecnologias

Fe - Ferro

H - Hidrogénio

IF – Imunofluorescência

ISCSEM – Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz

N - Azoto

NiT - Nitreto de Titânio

OMD - Ordem dos Médicos Dentistas

O - Oxigénio

PBS - Tampão Fosfato Salino

PVD - Deposição Física em Vapor de Fase

SEM - Microscopia eletrónica de varrimento

Ti - Titânio

TiO₂ - Dióxido de Titânio

Zr - Zircónio

I. INTRODUÇÃO

O impacto do edentulismo na saúde e bem-estar da população é um problema atual e que requer intervenção.

A falta de confiança e conforto, associados frequentemente ao uso de próteses removíveis, estão relacionados com embaraços e estigmas sociais que limitam significativamente a qualidade de vida do paciente. Nesse sentido, a implantologia tem assumido um papel crucial na reabilitação oral de pacientes com espaços edêntulos, com o intuito de restabelecer a estética e a função mastigatória.

As vantagens dos implantes são notórias, quer do ponto de vista funcional quer do estético, e o seu cariz fixo contribui de forma positiva para um incremento significativo da autoconfiança do paciente. Assim sendo, é necessário compreender e analisar as características e a influência dos materiais que existem atualmente, assegurando a sua perpetuidade e biointegração.

A osteointegração de um implante dentário depende da biocompatibilidade do material e das suas propriedades inerentes (químicas, físicas e estruturais), sendo a resposta celular e a cicatrização óssea peri-implantar, na interface implante-osso, frequentemente afetada pela topografia e rugosidade da superfície do implante.

Em Medicina Dentária, o titânio (Ti) é conhecido pelas excelentes características como biocompatibilidade, resistência à corrosão, baixa citotoxicidade e por potenciar a osteointegração, sendo o biomaterial de eleição para este fim.

Apesar das distintas características têm sido mencionadas algumas limitações. Para contornar essas limitações, o nitreto de titânio (TiN) foi sugerido com o intuito de melhorar a estética e as propriedades biomecânicas, promovendo o crescimento celular e reduzindo a adesão bacteriana, tornando este composto um substituto promissor.

No que diz respeito à produção deste composto, o método de PVD (Deposição Física em Vapor de Fase) apresenta vantagens singulares. Este método permite formar uma camada quase perfeita, que não se desintegra nem afeta a topografia da superfície do material sobre um substrato que pode ser, por exemplo, titânio.

Tendo em conta estas características e, uma vez que este composto já é usado na área da Medicina em instrumentos cirúrgicos e dispositivos médicos, pretende-se com este estudo revelar a caracterização da superfície de implantes dentários e de aditamentos protéticos, revestidos com TiN, comparando-a à superfície de implantes dentários e aditamentos protéticos de Titânio, comumente comercializados.

No seguimento desta investigação avaliou-se o revestimento de dois implantes e dois aditamentos protéticos revestidos com o composto de TiN e de dois implantes e dois aditamentos protéticos revestidos com por um composto constituído por três diferentes camadas, zircónio, carbonitreto de zircónio e nitreto de titânio (Zr/ZrCN/TiN), depositadas de forma consecutiva.

As amostras de aditamentos protéticos e de implantes foram cedidas por empresas. O revestimento das amostras foi realizado na empresa *Prirev – Equipamentos e Revestimentos Técnicos* e a sua caracterização foi efetuada nos Departamentos de Física e Engenharia de Materiais da Universidade de Aveiro, FCT/Universidade Nova de Lisboa e Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz.

A estruturação e o estado de arte do projeto final assentaram numa fundamentação teórica lógica e sequencial, através da revisão literária cuidada e com recurso a livros da especialidade.

II. ESTADO DE ARTE

2.1. EDENTULISMO

O edentulismo é definido pela ausência parcial ou total de dentes, congénita ou adquirida e apresenta-se como uma condição debilitante e irreversível.

A cárie, a doença periodontal e o trauma são as condições clínicas que constituem os principais motivos da perda dentária (Craddock, 2009). Além das causas clínicas, fatores demográficos, socioeconómicos, hábitos genéricos e de saúde oral e o acesso a cuidados de saúde têm sido frequentemente relacionados (Batista, Lawrence, & de Sousa, 2015; Emami, de Souza, Kabawat, & Feine, 2013; Montandon, Zuza, & de Toledo, 2012).

O número de peças dentárias e a posição que ocupam na arcada dentária pode ter uma série de consequências deletérias na saúde oral e na qualidade vida do indivíduo, (Batista et al., 2015; Emami et al., 2013) que se podem expressar pela diminuição da capacidade mastigatória e fonética, pelos prejuízos nutricionais, estéticos e psicológicos que interferem significativamente com a autoestima e integração social (Agostinho, Silveira, & Campos, 2015).

Em Portugal, segundo o Barómetro Nacional de Saúde Oral (BNSO) de 2015 (tendo sido utilizada uma amostra desproporcional estratificada para garantir uma margem de erro baixa nos resultados globais) dos portugueses inquiridos, apenas 28% têm a dentição completa, com exceção dos dentes do siso. Em 2014, 32% dos portugueses inquiridos afirmaram que têm falta de mais do que 6 dentes naturais, valor este que se mostrou crescente no BNSO de 2015, com um percentual de 37%, indicando uma tendência crescente no que diz respeito à perda de peças dentárias (figura 1) (OMD, 2015).

O tratamento desta condição pressupõe a reabilitação protética, existindo diversas abordagens na prática clínica para reabilitar espaços edêntulos.



Figura 1: Barómetro Nacional de Saúde Oral de 2015, em resposta à pergunta: “Q2. Com exceção dos dentes do siso, tem falta de dentes naturais?” (disponível em <https://www.ond.pt/barometro/docs/barometrosaudeoral2015.pdf>).

2.1.1. REABILITAÇÃO ORAL DE ESPAÇOS EDÊNTULOS

A reabilitação, após a perda de uma peça dentária, é fundamental para o restabelecimento da função e da manutenção dos dentes adjacentes e oponentes. Os pacientes nem sempre estão conscientes das opções terapêuticas de substituição dentária e a reabilitação deve ser restabelecida num curto espaço de tempo após a perda (Craddock, 2009).

A Prótese ou Reabilitação Oral é a área da Medicina Dentária responsável pela reabilitação do sistema estomatognático, que pressupõe a substituição artificial de um ou mais dentes naturais, parte de um dente, ou estruturas associadas por razões estéticas, funcionais, ou ambas (Boucher & Zwemer, 1993).

No mesmo estudo realizado pela Ordem dos Médicos Dentistas (OMD) no BNSO em 2015, averiguou-se que 54,0% dos portugueses não possuem reabilitação oral dos espaços edêntulos e apenas 4,7% possuem reabilitação fixa, representando uma quebra de 3 pontos percentuais relativamente a 2014 (OMD, 2015).

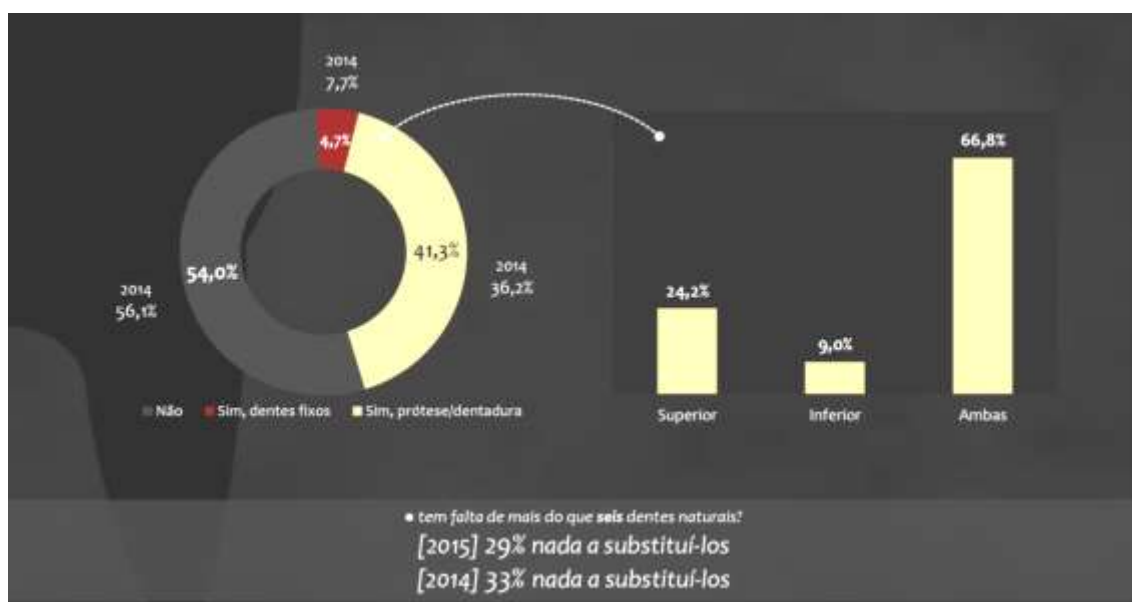
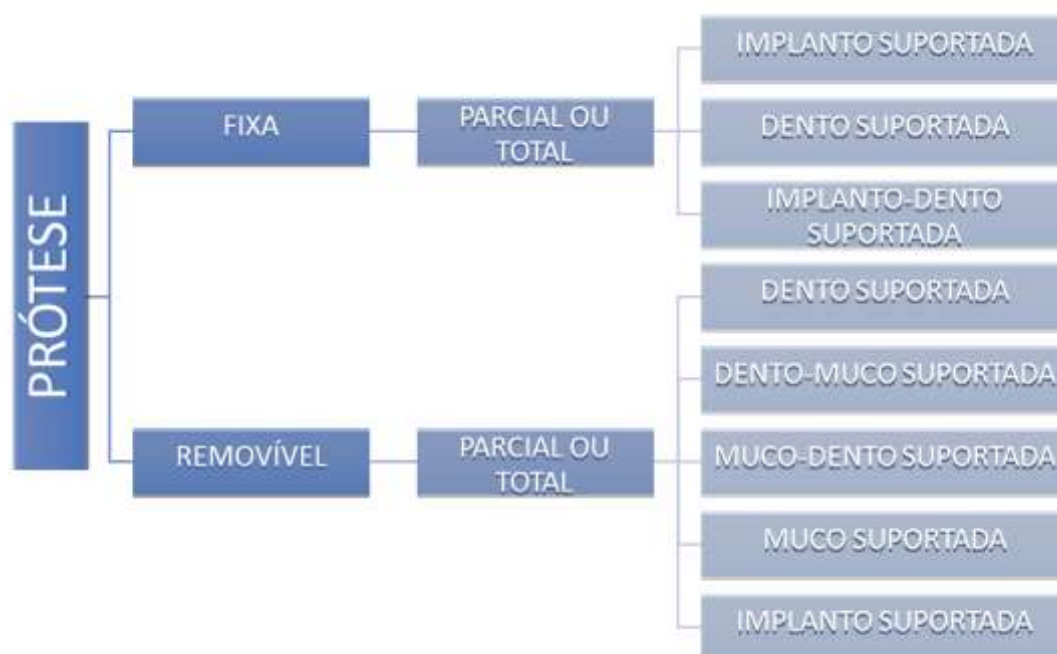


Figura 2: Esquematização do Barômetro Nacional de Saúde Oral de 2015, em resposta à pergunta: “Q2.1. Tem algo a substituí-los?” (disponível em <https://www.ond.pt/barometro/docs/barometrosaudeoral2015.pdf>).

A escolha do tratamento reabilitador depende de fatores como o número de elementos em falta e integrantes, o suporte e a respetiva relação com as estruturas adjacentes, a experiência do clínico e a vontade e disponibilidade do paciente. A esquematização que se segue resume as diferentes abordagens de tratamento praticáveis (Shillingburg, 2012).



No que diz respeito à prótese fixa, os implantes dentários osteointegrados são uma opção de tratamento cada vez mais viável e bem-sucedida, demonstrando taxas de sucesso de

até 96,8% (Charyeva, Altynbekov, Zhartybaev, & Sabdanaliev, 2012; Jung et al., 2008). No entanto, reabilitar dentes com implantes continua a ser um desafio, particularmente na região anterior, onde tanto o sucesso estético quanto o funcional são exigidos (Guez, 2002; Sadan, Blatz, Salinas, & Block, 2004).

As próteses implantossuportadas oferecem diversas vantagens quando comparadas com reabilitações removíveis e suportadas por tecido mole. O quadro que se segue lista as vantagens inerentes a este tipo de reabilitação:

VANTAGENS DAS PRÓTESES IMPLANTOSSUPORTADAS:

- Manutenção do osso
- Manutenção da dimensão vertical oclusal
- Posicionamento estético do dente
- Oclusão adequada
- Melhoria da saúde psicológica
- Recuperação da propriocepção
- Aumento da estabilidade
- Aumento da retenção
- Melhoria da fonética
- Redução do tamanho da prótese removível
- Aumento do índice de sucesso da prótese
- Aumento do tempo de duração da restauração
- Melhoria da função da prótese
- Manutenção dos músculos da mastigação e da expressão facial (Misch, 2011)

2.2. IMPLANTOLOGIA

O grande desafio da Medicina Dentária tem sido a pesquisa de procedimentos menos traumáticos e mais efetivos do ponto de vista funcional e estético na reabilitação de pacientes (Costa, Sousa, Lucena, & Souza, 2015). Neste contexto, surgiu a Implantologia como especialidade da Medicina Dentária, dedicada a restabelecer a função e a estética perdida, através da implantação cirúrgica de implantes em titânio e posterior colocação de peças protéticas de substituição.

A cirurgia é a área mais antiga da Medicina Dentária e a implantologia a segunda mais antiga. A implantologia moderna foi desenvolvida no final de 1960 com base nos estudos de Bränemark, passando a ser uma ciência evidente e bem documentada (Rodriguez y Baena, Rizzo, Manzo, & Lupi, 2017).

A implantação é definida como “a inserção de qualquer objeto ou material, como uma substância aloplástica ou outro tecido, parcialmente ou completamente no corpo, com objetivos terapêuticos, diagnósticos, protéticos ou experimentais.” Devemos distinguir implantação de reimplantação (reinserção na posição pré-avulsão acidental ou intencional) e transplantação (transferência de um tecido, órgão ou parte dele para outra parte do corpo do mesmo indivíduo) (Anusavice, Shen, & Rawls, 2013).

2.2.1. IMPLANTE

Os implantes dentários têm uma forma cilíndrica idêntica a de um parafuso e são colocados estrategicamente na maxila e/ou mandíbula com a finalidade de auxiliar a reabilitação das estruturas orofaciais perdidas. São compostos por dois componentes: o corpo do implante, que é introduzido cirurgicamente no osso, e o pilar transmucoso (aditamento protético) que faz a ligação entre o corpo do implante e o elemento protético. Macroscopicamente, o desenho do corpo do implante pode ser cilíndrico, rosqueável, nivelado, perfurado, sólido, oco ou aberto, com ou sem espiras. A superfície pode apresentar-se lisa e sem revestimento, revestida ou texturizada (Babbush, Hahn, Krauser, & Rosenlicht, 2010).



Figura 3: Diferentes tipos de desenho do corpo do implante da categoria de implantes de “forma radicular”, cujo o corpo utiliza uma coluna óssea vertical (C. E. Misch, 2006).

A história dos implantes com esta configuração específica data de milhares de anos e compreende civilizações antigas como a chinesa que há 4.000 anos esculpiam e martelavam brotos de bambu no osso, os egípcios há 2.000 anos e, mais recentemente, há 1.500 anos, os incas que esculpiam conchas do mar em estacas e fixavam-nas dentro do osso (Misch, 2011).

A Academia Americana de Implantologia em conjunto com outras Instituições de Saúde reconheceram, em 1988, o termo *forma radicular* para a categoria de implantes endósseos que se assemelham a raízes de dentes naturais (The JOI Glossary of Terms, 2016).

Na atualidade, existem inúmeros formatos disponíveis que oferecem distintas combinações de desenho do corpo do implante, diâmetro, formato da plataforma, comprimento, conexões protéticas, interfaces e condições de superfície. As diferentes micro e macro características, ao serem combinadas entre si, criam uma diversidade incalculável de desenhos e configurações possíveis (Alcoforado & Redinha, 2008; Misch, 2011).

A colocação do implante é um procedimento cirúrgico, com diferentes técnicas descritas na literatura. A mais comum compreende duas fases distintas: a primeira compreende o levantamento de um retalho mucoperiósseo, preparação do leito implantar, colocação do implante com um parafuso de cicatrização e recobrimento do implante com o retalho e respetiva sutura. O implante fica recoberto por mucosa entre 3 a 6 meses para que ocorra a osteointegração; na segunda fase cirúrgica o implante é exposto e o parafuso de cicatrização é substituído pelo pilar transmucoso, sobre o qual irá assentar o elemento protético. Existem, no entanto, outros protocolos como a carga imediata ou a colocação imediata em alvéolo pós-extração.

O desenho do implante tem como propósito alcançar a fixação clínica rígida correspondente ao contacto direto da interface osso-implante, microscopicamente, sem interposição de tecido fibroso. Não existe um sistema perfeito e a escolha pode ser desconcertante. O clínico facilmente pode ser tentado a optar por um sistema novo com características mais apelativas ou economicamente mais rentáveis. O sucesso do tratamento com recurso a implantes depende da experiência clínica e da escolha adequada do sistema a cada paciente (Alcoforado & Redinha, 2008).

Albrektsson propôs os seguintes critérios para o sucesso mínimo:

Um implante individual é imóvel quando testado clinicamente;

O exame radiográfico não revela qualquer radiotransparência peri-implante;

Após o primeiro ano de funcionamento, a perda vertical óssea radiográfica é inferior a 0,2 mm por ano;

O desempenho do implante individual é caracterizado pela ausência de sinais e sintomas como dor, infecções, neuropatias, parestesias ou interferência com o nervo alveolar inferior;

O implante deverá cumprir os critérios acima citados com uma taxa de sucesso de 85% no final de um período de observação de 5 anos e 80% no final de um período de 10 anos.

Os implantes endósseos são fruto de um longo processo de investigação levado a cabo por Brånemark, em 1969.

“A osteointegração envolve a ancoragem de um implante pela formação de tecido ósseo ao redor do implante sem crescimento de tecido fibroso na interface osso-implante” (Albert, Behrmann, & Barash, 1999).

A arquitetura do colagénio, presente na matriz óssea, é o principal determinante das propriedades mecânicas dos tecidos. Aquando da colocação cirúrgica do implante, existe um efeito na disposição do osso periimplantar que se traduz pela aplicação de uma tensão na interface (Davies, 1998; Delgado-Ruiz et al., 2015; Wang, Bank, TeKoppele, & Agrawal, 2001).

Verificou-se, através de estudos, que superfícies rugosas beneficiam a osteointegração devido à adesão inicial de proteínas não-colagénicas do osso, como a osteopontina e a sialoproteína, que migram para o local da lesão, bem como a nucleação do fosfato de cálcio nos locais de ligação do cálcio destas mesmas proteínas (Boerboom et al., 2007).

A osteointegração e consequente remodelação óssea envolve funções celulares sequenciais (fixação celular, migração e proliferação seguida da expressão de marcadores do fenótipo osteoblasto e a síntese, a deposição e a mineralização de uma matriz óssea), regulados por hormonas sistémicas e pela produção de fatores locais. A vascularização e a existência de um estímulo adequado são fundamentais para este processo (Davies, 1998).

Albrektsson *et al.*, em 1981, correlacionou alguns fatores que afetam diretamente o processo de osteointegração: a biocompatibilidade do material; o desenho do implante; as características de superfície do implante; o estado do leito implantar; a técnica cirúrgica utilizada e, por fim, as condições de carga aplicadas sobre o implante após a sua colocação (Alcoforado & Redinha, 2008).

O tipo de osso é um critério fundamental quando se opta por este padrão de reabilitação. A classificação de densidade óssea baseia-se em características macroscópicas da cortical e do trabeculado medular e foi preconizada por Mish em 1998.

- **I:** Osso cortical denso
- **II:** Cortical densa e osso trabeculado grosso
- **III:** Cortical óssea fina e trabeculado fino
- **IV:** Osso trabecular fino
- **V:** Osso não-mineralizado, imaturo (Iezzi et al., 2015)



Figura 4: Classificação dos tipos de osso fundamentada em características macroscópicas da cortical e do trabeculado medular preconizada por Mish em 1998 (disponível em <http://www.singularimplants.com.br/cone-morse-cilindrico>).

2.4. BIOCOMPATIBILIDADE

A biocompatibilidade pode ser definida como a capacidade de um material para extrair uma resposta biológica adequada do hospedeiro numa situação específica (Black, 2005).

A avaliação biológica de dispositivos médicos é realizada para determinar o potencial de toxicidade resultante do contato dos materiais do dispositivo com o corpo. Os materiais do dispositivo não devem, diretamente, ou através da liberação dos seus constituintes

materiais, produzir efeitos adversos locais ou sistêmicos significativos, ser cancerígenos, ou, produzir efeitos adversos reprodutivos e de desenvolvimento.

Portanto, a avaliação de qualquer novo dispositivo destinado ao uso humano exige dados de testes sistemáticos, para garantir que os benefícios fornecidos pelo produto final superem os riscos potenciais produzidos pelos materiais do dispositivo (FDA, 1998).

A biocompatibilidade pode ser avaliada por testes *in vitro* e *in vivo* (Daguano, Santos, & Rogero, 2007). A avaliação *in vitro* da biocompatibilidade é realizada por testes de citotoxicidade (Rogero, Lugão, Ikeda, & Cruz, 2003).

2.4.1. CITOTOXICIDADE

Citotoxicidade é descrita como sendo a capacidade intrínseca de um determinado material em potencializar alterações metabólicas nas células em cultura, podendo ou não culminar em morte celular (Rogero et al., 2003).

O teste de citotoxicidade *in vitro* é classificado segundo a *International Standard Organization*, ISO 10993-1, como o teste inicial para avaliar biocompatibilidade de materiais para uso de dispositivos médicos (Daguano et al., 2007; Rogero et al., 2003)(ISO 10993-1:2009).

O uso de culturas de células *in vitro* tornou-se uma prática recorrente dos laboratórios responsáveis pelo controlo de qualidade. Os testes *in vitro* apresentam vantagens quando comparados aos ensaios *in vivo* (Rogero et al., 2003): facultam resultados preliminares relacionados com a interação entre o material e o corpo biológico, de forma rápida e eficiente, apresentam alta reprodutibilidade e padronização, são financeiramente acessíveis e minimizam a necessidade de testes em animais pela substituição de linhagens animais e humanas (Craig & Powers, 2004; Sakaguchi & Powers, 2012).

Em implantologia, a biocompatibilidade e, neste caso, as propriedades citológicas são de extrema importância. A interação entre células e a superfície do material testado desempenha um papel importante, assim como a questão de saber se as funções fisiológicas básicas, ou seja, a capacidade do citoesqueleto para regenerar após a inoculação e a capacidade das células de se dividir, não foram danificadas.

O caráter da interação célula-material pode ser manifestado de diversas formas. O material pode não ser nem citotóxico, nem exibir qualquer comportamento mutagénico e,

ainda assim ser impróprio, devido ao relacionamento interrompido entre as células e o material testado.

Os principais parâmetros, que indicam a capacidade de osteointegração, dependem de como as células aceitam o material ou a superfície do material, como as células do citoesqueleto respondem em termos de regeneração do citoesqueleto, se a resposta celular ao material é positiva e, até que ponto, a divisão celular é mantida ou limitada (Prachar, Bartakova, Brezina, Cvrcek, & Vanek, 2015).

2.5. MATERIAIS BIOCOMPATÍVEIS

O Instituto Nacional de Saúde, em 1982, através da Declaração da Conferência de Desenvolvimento de Consenso, definiu biomaterial como “qualquer substância (diferente de fármacos) ou combinação de substâncias, de origem sintética ou natural, que podem ser usadas por qualquer período de tempo e que aumentam ou substituem parcial ou totalmente qualquer tecido, órgão ou função corporal.”

Os materiais biocompatíveis são especificamente desenvolvidos em função da aplicação a que se destinam e têm de obedecer a rigorosos parâmetros de segurança e qualidade para poderem ser aprovados pelas entidades reguladoras.

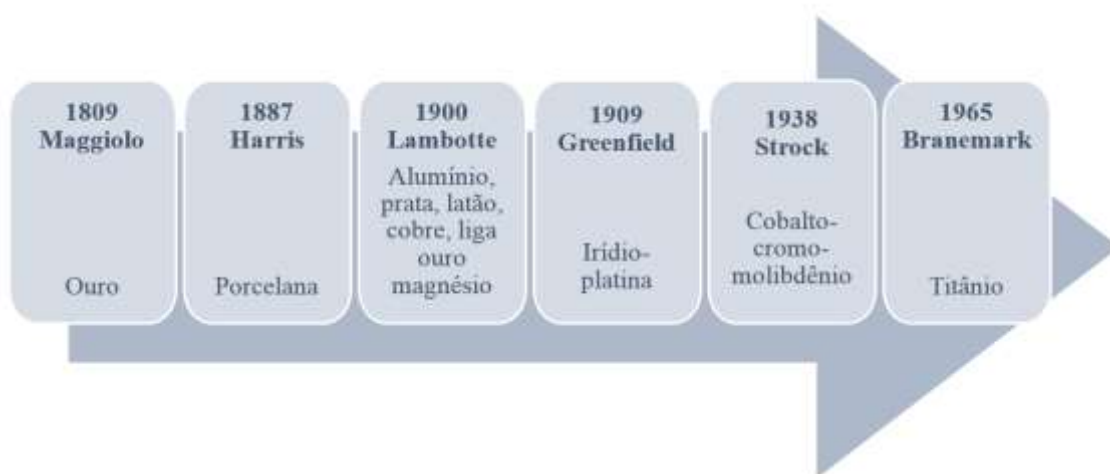
2.5.1. MATERIAS USADOS EM IMPLANTOLOGIA

Ao longo dos anos, diversos materiais foram testados para a confecção de implantes dentários. Os primeiros registos coincidem com civilizações antigas que testaram diferentes artefactos e matérias-primas que permitissem a ancoragem fixa. Na América Central, 600 a.C., a civilização Maia usou fragmentos de conchas marinhas posicionados em estacas. Existem ainda, registos que permitem inferir que, já no antigo Egípcio se usavam metais preciosos e no Médio Oriente brotos de bambu, devido à consequente necessidade de reposição de dentes perdidos (Misch, 2011).



Figura 5: Fotografia de uma mandíbula que data 600 a.C., da época Maia, onde foram encontrados, em 3 incisivos, fragmentos de conchas marinhas posicionados em estacas. É possível que tenha sido uns dos primeiros casos de sucesso de implantes realizado no ser humano (Ring & do Nascimento, 1995).

Em implantologia, vários materiais e ligas foram testados como possíveis alternativas. No entanto, estudos e resultados clínicos demonstraram que o resultado a médio longo-prazo e a taxa de sucesso eram bastante fracos para os requisitos aceitáveis em Medicina.



O desenho do implante, a conexão protética, a resistência mecânica do material, a resistência à corrosão, a disponibilidade, as considerações biomecânicas e os revestimentos/acabamentos de superfície são fatores que devem ser considerados na escolha do material para implantes (Anusavice, Shen, & Rawls, 2013).

Na atualidade, apenas o Ti comercialmente puro e a liga de Titânio-Alumínio-Vanádio (Ti6Al4V) apresentam resultados clínicos promissores e literatura que corrobora as suas aplicações clínicas em Medicina Dentária.

2.5.1.1. TITÂNIO

O titânio apresenta-se na tabela periódica como metal de transição leve, com número atômico 22, peso atômico 47,9 e ligações metálicas. Existe em abundância na natureza e apresenta-se como elemento puro. O titânio apresenta uma estrutura hexagonal compacta (HC) designada por Ti-(α) à temperatura ambiente. Quando submetido a temperaturas de 882 °C sofre uma transformação alotrópica para a estrutura cúbica de corpo centrado (CCC), denominada Ti-(β), estrutura que conserva até ao seu ponto de fusão $T = 1668$ °C (Anusavice et al., 2013).

O Ti comercialmente puro apresenta uma pureza na escala dos 98% a 99,5%. A quantidade de impurezas e de elementos residuais influenciam as propriedades físicas e determinam a classificação do titânio comercialmente puro (Davis & Metals, 1998).

O titânio e as suas ligas têm sido largamente utilizados como dispositivos biomédicos. As propriedades do titânio comercialmente puro, como a resistência à degradação eletroquímica e à fadiga, a biocompatibilidade e resposta biológica favorável, a densidade baixa, a alta resistência e as excelentes propriedades mecânicas tornam os materiais à base de titânio grandes atrativos para a Medicina Dentária (Craig & Powers, 2004; Ikarashi et al., 2005; Ralf-J Kohal, Att, Bächle, & Butz, 2008).

Relativamente ao seu uso em implantes dentários, a formação de uma camada estável de dióxido de titânio (TiO_2) à superfície, de espessura de 2 a 10 nm, e a baixa sinalização inflamatória fazem com que seja o material de eleição para este fim (Burkhardt, Joss, & Lang, 2008; Ikarashi et al., 2005). Estudos inferiram que, no caso de pacientes medicamente saudáveis, a taxa de sucesso em implantes dentários de titânio é de 90% a 95% (Diz, Scully, & Sanz, 2013).

O óxido que se forma na superfície do Ti ocorre na natureza em três fases distintas: anatase (tetragonal), brookite (ortorrômbica) e rutilo (tetragonal) (Anusavice et al., 2013). Surpreendentemente, a fase rutilo demonstra um aumento da resposta de células osteoblásticas, sendo menos provável que se inicie uma resposta inflamatória. Verificou-se também, que a dissolução de iões metálicos nesta fase tem uma ordem de magnitude inferior. Estas constatações sugerem que o potencial de biocompatibilidade possa ser superior às outras fases polimorfas cristalinas (Gaintantzopoulou, Zinelis, Silikas, & Eliades, 2014; Liu et al., 2013).

No que diz respeito à estética, principalmente na zona anterior da maxila, a cor cinzenta do titânio e a descoloração inerente a este material é considerada problemática, principalmente em biótipos gengivais finos, onde a cor cinzenta se pode evidenciar através da espessura da mucosa e em recessões gengivais, sendo normal existir perda vertical de 1 mm na crista alveolar, seguida de 0,1 mm adicional para cada ano subsequente, na zona periimplantar (Heydecke, Kohal, & Gläser, 1999; Ralf J Kohal, Weng, Bächle, & Strub, 2004). A recessão e a transparência da fina mucosa resultarão na visualização progressiva do implante com a exposição desagradável da superfície do metal de coloração escura (Ajlouni, Elshahawy, Ajlouni, & Sadakah, 2017).

Existem opções terapêuticas para solucionar este problema estético inerente ao uso de implantes de titânio de que é exemplo o aumento e o enxerto de tecidos, que permite aumentar a espessura da mucosa e cobrir a exposição ao metal. Ainda assim, o resultado estético imediato e a longo prazo é imprevisível e dispendioso (Bosco, Bonfante, Luize, Bosco, & Garcia, 2006; Burkhardt et al., 2008).

Apesar da biocompatibilidade ser reconhecida e ter sido largamente testada, a libertação e dissolução da superfície da liga de titânio e o aumento da concentração de iões metálicos na periferia periimplantar e em nódulos linfáticos regionais, responsáveis pelo desenvolvimento de periimplantites e reações alérgicas, tem levantado dúvidas acerca desta opção como biomaterial de eleição (Burkhardt et al., 2008; Ralf-J Kohal et al., 2008; Sridhar et al., 2015).

Mesmo havendo incerteza nas constatações clínicas, estes fatores negativos motivaram os pesquisadores a melhorar as propriedades físico-químicas e biológicas dos implantes através de várias modificações de superfície (Lou et al., 2015).

2.6. REVESTIMENTO E TRATAMENTO DE SUPERFÍCIE

A geometria, a topografia superficial e a composição dos substratos são cruciais para o sucesso a curto e longo prazo dos implantes dentários (Le Guéhennec et al., 2007).

Na tentativa de otimizar e solucionar os problemas com os materiais já existentes, houve um grande avanço científico no tratamento de superfície dos implantes dentários com o intuito de aumentar a interação material-osso, biocompatibilidade e melhorar o desempenho mecânico (Aboushelib, Osman, Jansen, Everts, & Feilzer, 2013; Delgado-Ruiz et al., 2011).

No que confere à rugosidade da superfície do implante, vários estudos comprovam um efeito significativo sobre a integração celular e evidenciam a associação existente entre o aumento da rugosidade nas superfícies de contacto e o comportamento celular traduzindo-se, a nível clínico, no aumento da osteointegração (Bornstein, Lussi, Schmid, Belser, & Buser, 2003; Thalji & Cooper, 2014; Trisi et al., 2003).

O aumento da rugosidade da superfície foi associado a aumentos na expressão de integrina para as células osteoblásticas, favorecendo a diferenciação dos osteoblastos e a proliferação celular (Lange et al., 2002). A rugosidade e a microtextura podem influenciar a disposição das fibras de colagénio na zona de interface implante-osso/tecido, aumentando o metabolismo, a orientação das células e a sua expressão fenotípica (Delgado-Ruiz et al., 2015; Kearns, Williams, Mirvakily, Doherty, & Martin, 2013).

Diversos tratamentos de superfície têm sido estudados e testados, entre eles a implantação de iões de magnésio, a deposição de hidroxiapatite ou fosfato de cálcio em nanocamadas, o condicionamento com ácidos fortes (ácido clorídrico, ácido fluorídrico ou ácido sulfúrico), o jateamento com partículas (óxido de titânio, óxido de alumínio, cloreto de sódio, hidroxiapatita, fosfato de cálcio) o processamento a laser, a sinterização de partículas e o spray plasma (Ellingsen, Thomsen, & Lyngstadaas, 2006; Tomé et al., 2015).

As superfícies de implantes dentários podem ser agrupadas em 5 grupos: usinadas, macrotextrizadas, microtexturizadas, nanotextrizadas ou biomiméticas (De Carvalho, Pellizzer, De Moraes, Falcón-Antenucci, & Ferreira Júnior, 2009).

Estas técnicas de texturização de superfície têm sido aplicadas para criar diferentes geometrias e graus de rugosidade da superfície. As modificações de superfície visam melhorar as interações celulares com a superfície do implante, estimular a atividade celular, melhorar a osteointegração e a resistência da interface osso-implante para estabilizar a carga funcional (Delgado-Ruiz et al., 2011; Ellingsen et al., 2006).

A nanotecnologia oferece novas formas de interagir com processos biológicos relevantes e fornece meios de compreensão e realização de funções específicas de células (Mendonça, Mendonça, Aragao, & Cooper, 2008).

Na última década, tem havido um interesse crescente em estruturas mensuráveis na nanoescala, havendo uma associação comprovada que suporta o papel da nanotopografia

com os estágios iniciais do processo de cicatrização óssea e aumento da resposta celular, verificando-se uma resposta óssea mais rápida em superfícies rugosas (Aboushelib, Osman, Jansen, Everts, & Feilzer, 2013; Svanborg, Andersson, & Wennerberg, 2010). Os dados existentes sugerem que passos críticos na osteointegração podem ser modulados pela modificação em nanoescala da superfície do implante (Barbosa, 2015; Mendonça et al., 2008; Svanborg, Andersson, & Wennerberg, 2010).

Os processos de tratamento de superfície podem ser divididos em dois grupos: adição e subtração. No método de adição, é aplicado à superfície do implante um revestimento, que poderá ser ou não do mesmo material do implante e, no método de subtração é removida parte da camada superficial do implante (Brandão et al., 2010).

Os revestimentos em Ti, em estruturas simples ou multicamadas, possuem aplicações de ampla gama em vários campos, nomeadamente instrumentos cirúrgicos e dispositivos biomédicos. Diferentes métodos foram utilizados para preparar filmes com base em Ti, cujas propriedades dependem do método e das condições de deposição. A técnica de deposição de arco catódico é versátil, de alta produtividade e eficiente, com capacidade de preparar uma grande variedade de compostos binários e multifásicos rígidos.

A deposição confere à superfície elevada dureza e um coeficiente de atrito muito baixo, proporcionando uma excelente barreira a ambientes quimicamente agressivos e uma taxa de difusão para os tecidos circundantes baixa ou quase nula (Balaceanu et al., 2002).

No presente trabalho, reportamos sobre a síntese e caracterização nos revestimentos rígidos de TiN monocamada e Zr/ZrCN/TiN multicamadas, depositados em diferentes substratos pela técnica do arco catódico.

2.6.1. NITRETO DE TITÂNIO

Samuel Steinemenan, em 1972, patenteou o uso de implantes de titânio ou liga de titânio para o tratamento cirúrgico de ossos. “Um implante de titânio ou titânio com a característica inovadora da camada superficial formada como um óxido, nitreto, carboneto e carbonitreto. A camada superficial é aplicada para evitar a abrasão e a corrosão do implante e para evitar o desgaste entre os implantes de contato, bem como para melhorar a sua aparência”.

Buechel e Pappas, em 1997, patentearam a "prótese com superfície resistente ao desgaste biologicamente inerte". As superfícies de suporte de carga são revestidas com material resistente à abrasão biologicamente inerte, tal como o TiN, de preferência 8 a 10 µm de espessura, mais resistente do que o substrato para prevenir o desgaste e a lixiviação/dissolução de íons para os tecidos circundantes (Fredrick F Buechel & Pappas, 1999).

Recentemente, na área da Medicina, houve um crescente interesse no revestimento de TiN. O TiN é uma cerâmica que tem propriedades gerais, como grande dureza (2000 kg/mm²), alta temperatura de decomposição (2949 °C), resistência notável ao desgaste e corrosão, estabilidade química em temperatura ambiente, biocompatibilidade intrínseca, supercondutividade e cor dourada-amarela que permite a camuflagem sob o tecido gengival (Maurer, Brown, Payer, Merritt, & Kawalec, 1993; Toth, 2014; van Hove, Sierevelt, van Royen, & Nolte, 2015).

Este revestimento biologicamente inerte foi aprovado pela *Federal Food and Drug Administration*. Em várias experiências *in vitro*, os implantes revestidos com TiN apresentaram menor desgaste de polietileno e metal, quando comparados com outros materiais utilizados para próteses ortopédicas e dentárias, mostrando propriedades de tolerância ao sangue encorajadoras com uma percentagem de hemólise perto de zero (Dion, Baquey, Candelon, & Monties, 1992).

Annunziata *et al.* relataram recentemente que este revestimento mostra uma função dupla na promoção da formação óssea e na redução da adesão bacteriana. Piscanec *et al.*, em 2004, demonstraram que a nitretação de superfícies de implantes de titânio, sob condições fisiológicas, pode promover a formação *in vivo* de material semelhante a osso (Piscanec *et al.*, 2004).

Esses achados refletem um grau de bioatividade elevado, o que pode ser de grande importância no processo de osteointegração de implantes revestidos com TiN. No entanto, a pesquisa para avaliar as propriedades da superfície e a biocompatibilidade, para aplicação como implante, raramente foi realizada (Mezger & Creugers, 1992).

III. OBJETIVOS

Este trabalho de investigação tem como principais objetivos:

1. A caracterização da superfície de implantes e de aditamentos protéticos, revestidos com Nitreto de Titânio, do ponto de vista mecânico, químico e biológico;
2. Comparação com a superfície de implantes revestidos a Titânio comercializados atualmente.

IV. HIPÓTESES

Hipótese Nula 1

Os implantes com revestimento de nitreto de titânio apresentam melhores características mecânicas, químicas e biológicas que os implantes de titânio.

Hipótese Alternativa 1

Os implantes com revestimento de Nitreto de Titânio apresentam piores características mecânicas, químicas e biológicas que os implantes de Titânio.

- **Hipótese Nula 2**

A adesão do revestimento de TiN não revela destacamento do substrato.

- **Hipótese Alternativa 2**

A adesão do revestimento de TiN não revela destacamento do substrato.

- **Hipótese Nula 3**

O revestimento de TiN apresenta porosidade controlada.

- **Hipótese Alternativa 3**

O revestimento de TiN não apresenta porosidade controlada.

- **Hipótese Nula 4**

O revestimento de TiN revela capacidade de adesão e proliferação celular.

- **Hipótese Alternativa 4**

O revestimento de TiN não revela capacidade de adesão e proliferação celular.

- **Hipótese Nula 5**

O revestimento de TiN, do ponto de vista biológico *in vitro*, é biocompatível (não é citotóxico).

- **Hipótese Alternativa 5**

O revestimento de TiN, do ponto de vista biológico *in vitro*, não é biocompatível (é citotóxico).

- **Hipótese Nula 6**

As células que aderem ao revestimento de TiN adotam uma morfologia característica do seu fenótipo.

- **Hipótese Alternativa 6**

As células que aderem ao revestimento de TiN não adotam uma morfologia característica do seu fenótipo.

- **Hipótese Nula 7**

O revestimento de TiN, do ponto de vista biológico, mantém uma atividade metabólica indutora da mineralização, avaliada através da enzima da fosfatase alcalina (ALP).

- **Hipótese Alternativa 7**

O revestimento de TiN, do ponto de vista biológico, não mantém uma atividade metabólica indutora da mineralização, avaliada através da enzima da fosfatase alcalina (ALP).

V. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. TIPO DE ESTUDO

Trata-se de um estudo clínico experimental *in vitro* com a finalidade de caracterizar e comprovar a segurança do revestimento de TiN e verificar a sua resposta biológica.

5.2. LOCAL DE REALIZAÇÃO DO PROJETO

A investigação realizou-se na Universidade de Aveiro, no Departamento Física e Engenharia de Materiais; na FCT/Universidade Nova de Lisboa, no Laboratório de Biomateriais e Engenharia de Tecidos e, na empresa *Prirev*. Decorreu entre os meses de maio de 2017 e outubro de 2017.

5.3. APROVAÇÃO E CONDIÇÕES

Este projeto foi apresentado para obtenção de grau de Mestre em Medicina Dentária, no Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz. Foi sujeito a aprovação pela Comissão Científica do Mestrado Integrado em Medicina Dentária do ISCSEM.

As entidades envolvidas no projeto, Universidade de Aveiro, a empresa *Prirev – Equipamentos e Revestimentos Técnicos* e a FCT/Universidade Nova de Lisboa autorizaram a realização do estudo nas respetivas instalações. (Anexo I, II e III)

5.4. AMOSTRAS

Para a realização desta investigação foi necessário reunir algumas amostras dos materiais em estudo e criar condições para a realização dos testes clínicos. Durante o projeto, decidiu-se inserir uma nova variável ao estudo e testar/analisar um revestimento multicamadas de Zr/ZrCN/TiN que estava a ser aplicado pela Empresa *Prirev*, para dar resposta a alguns problemas inerentes ao revestimento de TiN.

Para os ensaios *in vitro* de adesão e proliferação celular, morfologia, fosfatase alcalina e para os ensaios mecânicos, uma vez que a arquitetura dos implantes e aditamentos protéticos não se enquadram nos parâmetros dos testes, houve a necessidade de revestir placas de aço inox (forma circular, diâmetro 14mm) com os revestimentos em estudo (TiN e multicamada (Zr/ZrCN/TiN)).

Como controlo do processo de revestimento e para facilitar a análise das amostras foram usadas placas de silício nos ciclos de PVD juntamente com os implantes e aditamentos protéticos.

Tabela 1: Tabela descritiva das amostras usadas no projeto.

AMOSTRAS	Nº	MODELO COMERCIAL	REVESTIMENTO	DIÂMETRO	COMPRIMENTO	MÁQUINA	CICLO	TEMPO
Implante	2	Exaktus® Cilíndricos Biodent HEX RP	Titânio Comercialmente Puro (Tipo IV)	3,75 mm	13 mm	Comercial	Comercial	Comercial
Implante	2	HI-TEC Implants®	TiN	3,75 mm	10 mm	Kenosistec	K3606	2h
Implante	2	HI-TEC Implants®	Multicamadas (Zr/ZrCN/TiN)	3,75 mm	10 mm	Microcoat	M862516	2h20m
Aditamento Protético	2	Exaktus® Kerator BHI	TiN	3,5 mm	4 mm	Comercial	Comercial	Comercial
Aditamento Protético	2	Tipo Locator	TiN	3,5 mm	4 mm	Kenosistec	K3606	2h
Aditamento Protético	2	Tipo Locator	Multicamadas (Zr/ZrCN/TiN)	3,5 mm	3 mm	Microcoat	M862516	2h20m
Placas Aço-Inox	10	-----	TiN	14 mm	-----	Kenosistec	K3606	2h
Placas Aço-Inox	10	-----	Multicamadas (Zr/ZrCN/TiN)	14 mm	-----	Microcoat	M862516	2h20m

5.5. MATERIAIS

Para a produção dos filmes de TiN e Zr/ZrCN/TiN foram usados alvos de titânio de grau 2 (com pureza mínima superior a 99,7% e com elementos residuais de ferro (Fe), carbono (C), oxigénio (O), azoto (N) e hidrogénio (H)) e alvos de zircónio (Zr) (com pureza mínima superior a 99,6% e elementos residuais de Ti, Fe, háfnio (Hf), C, O, N e H).

Foram utilizados os gases árgon e nitrogénio com pureza mínima de 99,9997% e o gás metano com pureza mínima de 99,9995%.

5.6. METODOLOGIA

5.6.1. PROCESSO DE DEPOSIÇÃO DO FILME

O método PVD é uma das técnicas possíveis para revestir materiais biocompatíveis. Esta técnica permite formar uma camada quase perfeita de um material, que não se desintegra nem afeta a topografia da superfície, podendo ser aplicado em aço, aço inox, latão, alumínio, zamak, polímeros e superfícies cerâmicas.

Berghaus, em 1938, patenteou o processo de PVD. No entanto, para consolidar os princípios propostos por Berghaus, Mattox, no início da década de 60, descobriu as deposições iónicas que possibilitaram industrializar e ampliar os conhecimentos em sistemas de vácuo. Com a revolução tecnológica foi possível desenvolver sistemas de vácuo, fontes de alimentação e tecnologia de ponta que permitiu otimizar a produção dos revestimentos. De uma forma simplista pode ser descrito em quatro etapas: evaporação, transporte, reação e deposição, como ilustrado na figura seguinte.

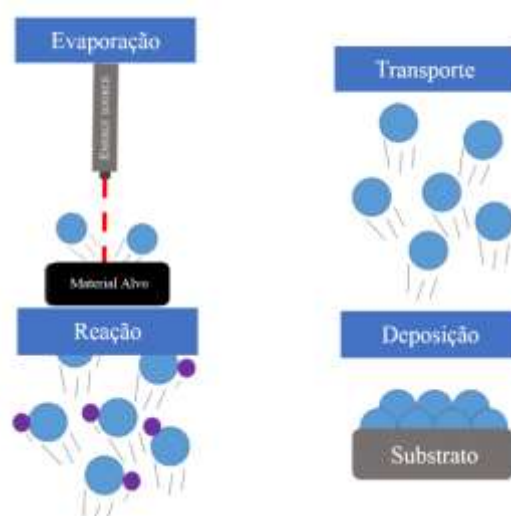


Figura 6: Ilustração do processo de PVD.

O revestimento PVD com TiN e multicamada Zr/ZrCN/TiN apresenta vantagens inigualáveis em instrumentos cirúrgicos e dispositivos médicos, nomeadamente próteses e implantes. Este processo confere elevada dureza (>2500 HV) aliada a um coeficiente de atrito muito baixo ($<0,70 \mu$), proporcionando uma maior aptidão ao corte em instrumentos cirúrgicos; densidade muito elevada, que proporciona uma excelente barreira a qualquer ambiente quimicamente agressivo; e, uma excelente biocompatibilidade, apresentando uma taxa de difusão baixa ou nula, prevenindo a passagem do material da prótese para os tecidos circundantes.

A tecnologia “random arc” utilizada pela empresa *Privev – Equipamentos e Revestimentos Técnicos*, no processo de PVD, permite uma ionização superior e a deposição de revestimentos funcionais a relativamente baixa temperatura ($200 - 450^\circ\text{C}$) fazendo com que, esse parâmetro não influencie as características do substrato. Esta tecnologia, por não produzir qualquer tipo de resíduo, pode ser considerada uma tecnologia verde.

No processo por arco catódico, o conceito básico envolve a criação do arco através da aplicação de uma densidade de corrente elevada vaporizando o material existente no alvo. Este material será direcionado para o substrato de forma controlada, usando para isso uma diferença de potencial entre o alvo e o substrato (BIAS). Nesta fase é criado um plasma através da ionização dos iões de argon (gás raro) injetados para o interior da câmara. Outros gases podem ser usados durante o processo, como é exemplo o N, que irá reagir com os elementos vaporizados do alvo.

Este processo tem como principal vantagem uma maior densidade de vaporização quando comparado com técnicas concorrentes (vaporização térmica); os cátodos podem ser posicionados em distintas configurações e as fontes de alimentação necessárias são de relativamente baixa potência. Como principais desvantagens deste processo podemos mencionar a dificuldade de revestir peças com geometrias complexas e a possível produção de macropartículas (*droplets* $1-15 \mu\text{m}$).



Figura 7: Ilustração do processo de deposição por arco catódico.

Para que o produto final tenha as características necessárias, é importante que na fase inicial do processo as peças sejam devidamente limpas (remoção de resíduos orgânicos e inorgânicos), preparadas e carregadas na câmara. No interior da câmara a pressão desce (na ordem dos 10^{-5} mbar) e inicia-se o aquecimento dos substratos a revestir. Após esta fase é promovida a corrosão iônica na superfície do substrato para maximizar a aderência ao revestimento. Inicia-se a fase de deposição e, após a finalização deste ciclo, o substrato é arrefecido lentamente e as peças retiradas da câmara, prontas para serem embaladas e entregues.



Figura 8: Máquinas (*Privev – Equipamentos e Revestimentos Técnicos*) - usadas no processo de revestimento das amostras. A da esquerda Kenosistec - Recipe TiN-SRAM e a da direita Microcoat - Multicamadas Zr/ZrCN/TiN.

A deposição por arco catódico ocorre numa câmara de baixas pressões e consiste na evaporação do material de revestimento presente nos alvos, através de um arco elétrico de alta potência, e consequente condensação do material sobre o substrato a revestir.

O processo, no interior da câmara, inicia-se com a incidência de um arco, criado por uma descarga de alta corrente e baixa tensão através de um gás altamente ionizado, sobre os “*targets*” que contêm o material do revestimento (o cátodo). A temperatura aumenta e provoca pequenas crateras no “*target*” devido à remoção de material. O arco vai-se extinguindo e reincidindo em novas crateras, provocando a ilusão de movimento do arco. O cátodo é posteriormente arrefecido com água, havendo projeção de jatos de material (iões do material altamente ionizados e partículas) no estado gasoso, que podem alcançar velocidades de 10 km/s.

O tamanho das partículas presentes no respetivo jato de material expelido pelo “*target*”, varia consoante o ponto de fusão do material e a velocidade. Pontos de fusão e velocidade de arco inferiores resultam em partículas com um diâmetro maior. Obtêm-se partículas de dimensões inferiores quando a velocidade e o ponto de fusão são superiores.

Durante o processo pode ocorrer uma emancipação de macropartículas consequente da prolongada incidência do arco sobre o cátodo e evaporação longa. Estas partículas, definidas por “*droplets*”, são depositadas juntamente com o revestimento.

O número de partículas libertadas ao longo do processo pode ser reduzido. Para isso podemos reduzir a corrente do arco, aumentar a distância entre os “*targets*” e o substrato, aumentar a pressão do gás ou aplicar um campo magnético coaxial para aumentar a densidade.

As tabelas que se seguem sumarizam os parâmetros de deposição, usados pela empresa, para as amostras em estudo.

Tabela 2: Parâmetros de deposição do revestimento com TiN.

KENOSISTEC - Recipe TiN-SRAM		
Parâmetros		Valores
Tecnologia		PVD <i>random arc</i>
Ciclo nº		1K3606 2K2963
Data de Produção		29/07/17 25/09/17
Corrente		540 A
Fluxo de Gás (%)		
Passos	Árgon (%)	Reativo (N ₂) (%)
0 (Ti)	100	0
1	90	10
2	40	60
3	17	83
4	30	70
Pressão Total durante a Deposição		~7x10 ⁻³ mbar
Temperatura de Deposição		165 °C
Tempo de Deposição - Ciclo		60 minutos

Tabela 3: Parâmetros de deposição do revestimento com Multicamadas Zr/ZrCN/TiN.

MICROCOAT - Multilayer (Zr/ZrCN/TiN)			
Parâmetros		Valores	
Tecnologia		PVD <i>random arc</i>	
Ciclo nº		M8622/3 M8792	
Data de Produção		28/08/17 21/09/17	
Corrente		360 A	
Fluxo de Gás (%)			
Passos	Árgon (%)	Reativo CH4 (%)	Reativo N2 (%)
1 (Zr)	100	0	0
2	100	0	0
3	90	0	10
4	10	10	80
5	10	20	70
6	20	0	80
7	20	0	80
8	30	0	70
Pressão Total durante a Deposição		~ 5x10 ⁻³ mbar	
Temperatura de Deposição		250 °C	
Tempo de Deposição - Ciclo		45 minutos	

5.6.2. MÉTODOS DE ANÁLISE DE SUPERFÍCIE

A escolha de métodos de análise adequados é muito importante para obter resultados confiáveis. Nesta seção, será descrita uma breve abordagem dos princípios dos métodos de análise usados na caracterização, teorias gerais e aspectos técnicos.

5.6.2.1. DIFRAÇÃO DE RAIOS X (MICROESTRUTURA) – DRX

A difração de raios-X é uma ferramenta de caracterização primordial nas investigações atuais. Consiste numa técnica não-destrutiva e caracteriza-se pela incidência de um feixe de raios-X, de comprimento de onda conhecido, sobre a amostra que será difratado consoante as distribuições atômicas dos cristais.

Todo o sólido cristalino tem seu padrão de difração de raios-X próprio e exclusivo, assim como fases distintas dos mesmos materiais. A difração de raios-X é utilizada para estudos estruturais de amostras, sendo possível obter informações sobre presença de fases cristalinas, orientação de cristais, tamanho médio de cristais (tamanho de grão), parâmetros da célula unitária, tensões internas, entre outros.

Quando uma amostra cristalina é exposta a um raio de raios-X dentro de um certo ângulo, os planos de cristal da amostra atuam como uma grade de difração. Conhecer o comprimento de onda (λ) do raio de raios-X incidente e o ângulo (θ) entre o feixe incidente e o plano de cristal torna possível a determinação da distância entre os planos de cristal (d), como sugere a lei de Bragg:

$$n\lambda = 2d_{hkl}\sin(\theta),$$

onde n é um número inteiro (1, 2, 3, ...) comumente 1. A intensidade dos picos de difração depende da simetria de cristal e do tipo de átomos que constituem a amostra cristalina.

Obtemos como resultado um gráfico de intensidade de sinal, denominado difratograma, em que a posição dos picos está relacionada com os parâmetros da célula unitária do cristal, isto é, com as distâncias interplanares. A análise destes parâmetros permite a identificação da fase cristalina presente na amostra. As análises de raios-X podem ser realizadas usando diferentes fontes de raios-X e configurações para o incidente e o feixe difratado. Normalmente, os feixes são sincronizados, iguais, em relação à superfície da amostra, e com esta geometria (geometria Bragg-Bretano) somente os planos de cristal paralelos à superfície da amostra são detetados. Tipicamente, os sistemas de difração usam um feixe monocromático divergente. O feixe difratado converge e concentra-se no círculo de difração.

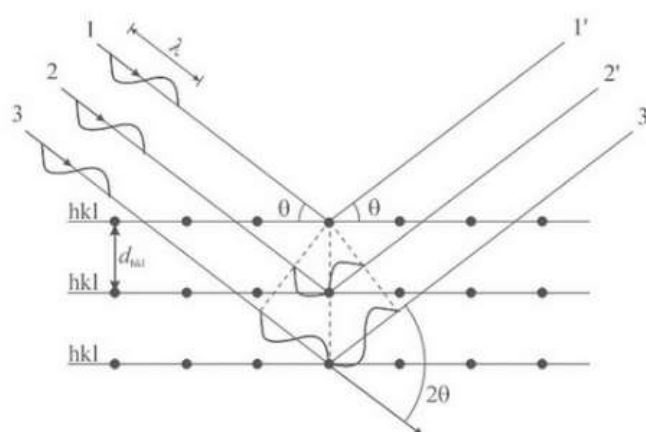


Figura 9: Ilustração da difração de raios-X nos planos atômicos de um cristal, de acordo com a condição de Bragg (adaptado de Williams, 2017).

Em estudos relacionados com este trabalho, o aparelho utilizado foi o de difração de raios-X incidente de pastagem, PANvertical XPert-Pro, com um ângulo incidente omega de 2° , passo de 197.115, tamanho de passo $[2\theta]$ de 0,02 e faixa de varredura de 5° a 80° . A fonte de raios-X utilizada foi uma Vitral Empyrean ($K\alpha$ -1,54060 Å) LFF HR (9430 033 7310 x) DK377331 operada a 45 kV e 40 mA.

5.6.2.2. PERFILOMETRIA ÓTICA 3D

A Perfilometria Ótica é um instrumento de medição de superfície amplamente utilizado para avaliação de parâmetros de rugosidade superficial e medições de filme. Consiste na ampliação da área observada (de milímetros) conferindo uma ampla representatividade da amostra. A imagem tridimensional criada constitui um grande número de perfis calculado ao longo da área ou superfície selecionada, sendo registrados como uma distribuição de alturas (picos e vales).

Os perfilômetros, recentemente comercializados, possuem diferentes modos de imagem para medição da rugosidade, como a variação de foco (permite uma menor resolução e qualidade de imagem), a microscopia confocal (adequado para superfícies com alta inclinação), a interferência luminosa e a interferometria de fase (permite maior resolução vertical). A seleção da técnica adequadas fornece mais informações e detalhes sobre a topografia para cada tipo de amostra.

Neste trabalho, a avaliação da superfície foi realizada com um Perfilômetro Ótico 3D S-NEOX e o modo de imagem foi selecionado em função da amostra.

5.6.2.3. MICROCOPIA ELETRÓNICA DE VARRIMENTO (SEM)

SEM é uma técnica que permite analisar a microestrutura dos revestimentos e o tipo de crescimento e orientação que ocorre durante o processo de deposição. Este método de análise possibilita a obtenção de imagens de alta resolução numa extensa gama de ampliação de uma amostra, quando comparada com o microscópio ótico. Esta ferramenta laboratorial permite visualizar a presença de defeitos na estrutura, como a falta de aderência do revestimento ao substrato, falhas, microfissuras e vazios e, medir a estimar a espessura do revestimento. As imagens obtidas por esta técnica, micrografias, resultam da interação de um feixe de elétrons, com energia entre 2 e 50 keV, sendo os sinais obtidos, a partir de um volume de emissão específico dentro da amostra, usados para caracterizar a amostra.

A interação do feixe de elétrons com a superfície da amostra resulta em várias reações das quais se destacam a emissão de elétrons secundários, elétrons retrodifundidos, elétrons de Auger e raios-X.

O espectro de elétrons Auger, tipicamente com energias que variam entre 20 e 2500 eV, são característicos de cada elemento químico e podem ser utilizados para determinar uma análise química superficial. O comprimento de onda dos fótons (raios-X) emitidos também é característico de cada elemento químico e o sinal detetado pode ser usado para realizar a microanálise elementar qualitativa e quantitativa através da espectroscopia de raios-X de energia dispersiva (EDS ou EDX).

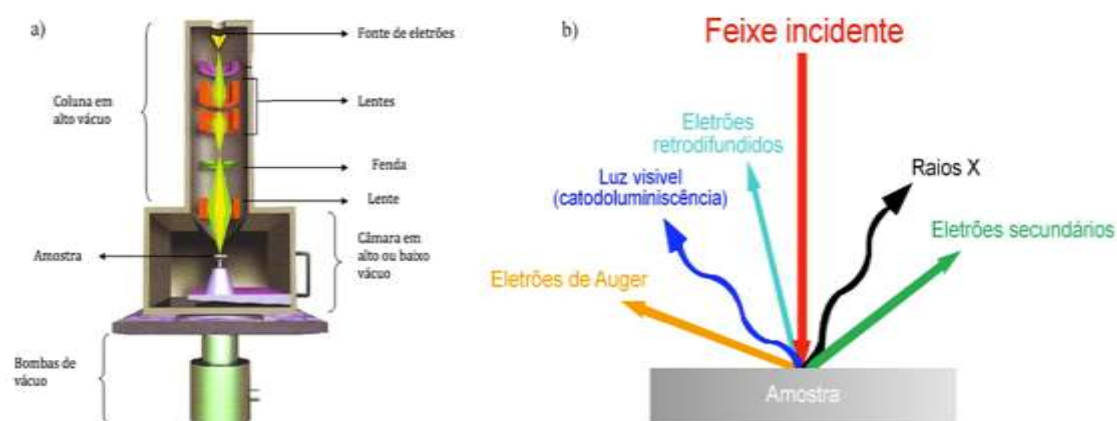


Figura 10: a) Princípio de geração do feixe de elétrons num sistema SEM; b) Interação do feixe de elétrons energéticos com a matéria (adaptado de <http://micelectro.fc.ul.pt/page2/page2.html>).

A superfície, a morfologia da seção transversal e a avaliação da espessura de filmes depositados foram estudados pelo microscópio eletrónico de varrimento Tescan VEGA3 com tensão operacional de 30 kV.

5.6.2.4. ESPECTROSCOPIA DE RAIOS-X POR DISPERSÃO DE ENERGIA (EDXS)

EDXS é uma técnica simples para mapear distribuições espaciais elementares. Basicamente, esta técnica consiste em varrer a amostra com um feixe de elétrons. Este processo gera raios-X que são analisados com um espectrómetro de energia.

A informação contida nestes espectros é a contagem de raios-X a partir de elementos específicos apresentados na amostra. As imagens EDXS para este trabalho experimental foram obtidas num VEGA3 da Tescan equipado com um espectrómetro de energia dispersiva da Bruker.

Os espectros de EDXS foram registados numa região de energia de ligação de 0-30 KeV.

5.6.3. TESTES MECÂNICOS

5.6.3.1. TESTE DE *PULL-OFF* – ADESÃO

A abordagem para determinar a adesão dos filmes de TiN usada foi através de métodos mecânicos de medição. Os métodos mecânicos para o estudo da adesão ao substrato são normalmente classificados em duas categorias dependendo do modo de arrancamento do filme: i) métodos que envolvem o arrancamento normal do filme relativamente ao plano

do substrato e ii) métodos que envolvem o arrancamento lateral do filme relativamente ao substrato.

O método de arrancamento utilizado para determinar a adesão dos filmes de TiN faz parte da classe dos métodos que envolvem o arrancamento normal do filme relativamente ao plano do substrato.

O princípio de funcionamento consiste em colar um pino de alumínio na parte de trás do filme que, após a cura da cola, é puxado na direção perpendicular através de um dispositivo de tração. Os resultados do ensaio de adesão do tipo enunciado atrás são: a pressão de arrancamento e a classificação do tipo de fratura (que pode ser: fratura coesiva; fratura adesiva ou falha de cola). Na figura seguinte encontra-se um esquema do princípio de funcionamento do equipamento usado para determinar a adesão dos filmes de TiN.

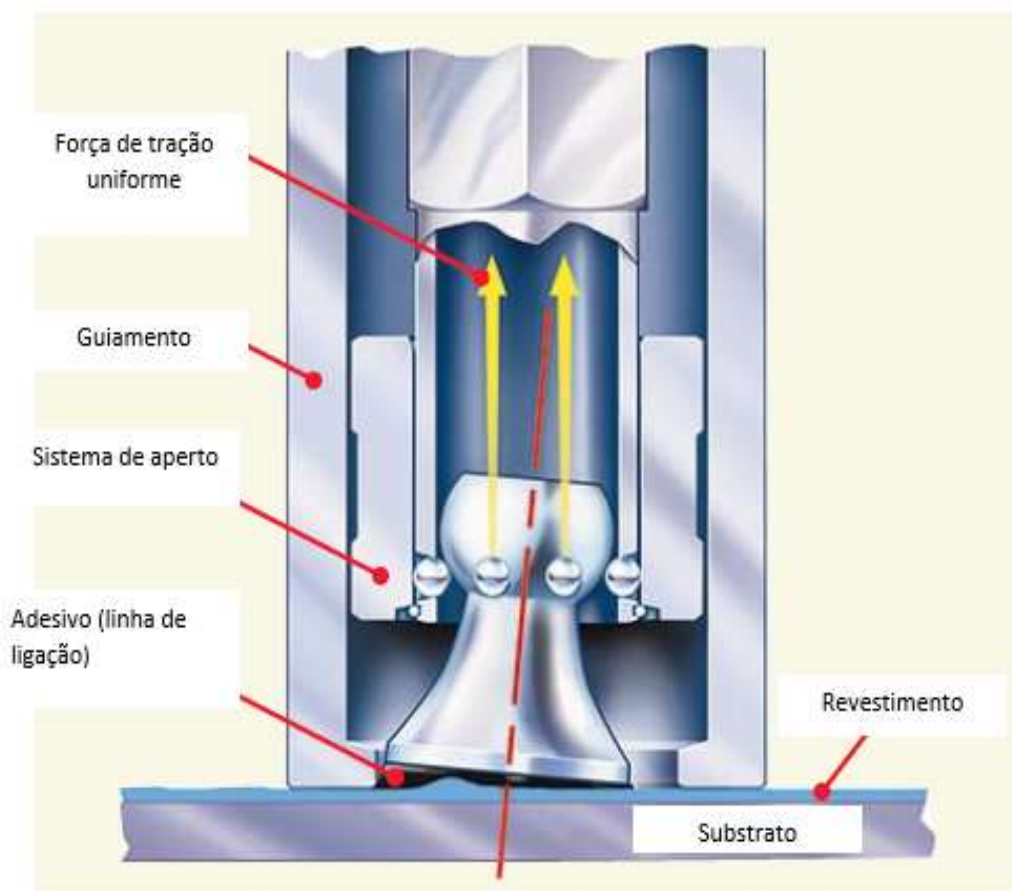


Figura 11: Esquemática do princípio de funcionamento do equipamento usado para determinar a adesão dos filmes de TiN (adaptado de <http://docplayer.net/53417764-Defelsko-catalog-summer-coating-thickness-gages-and-inspection-instruments.html>).

Na figura 12 pode-se encontrar um esquema representativo da análise visual do ponto de vista do tipo de fratura.

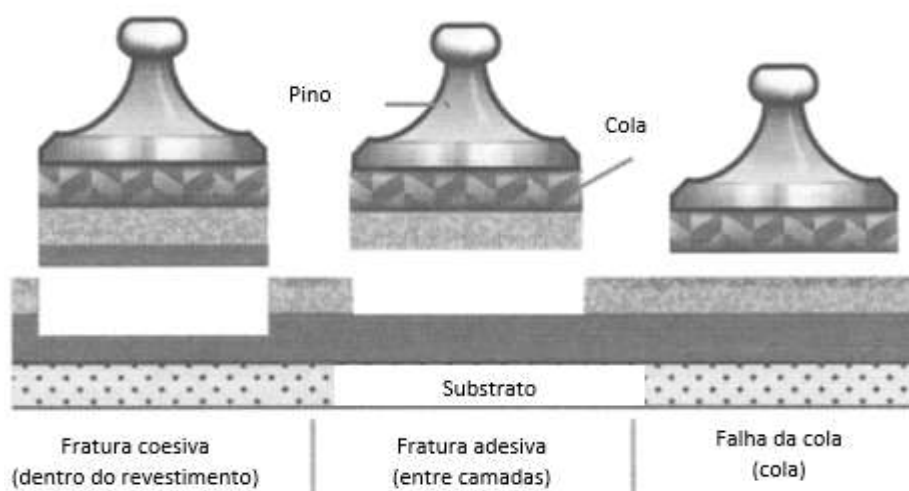


Figura 12: Esquemática representativa da análise visual do tipo de fratura no teste de adesão (adaptado de <http://docplayer.net/53417764-Defelsko-catalog-summer-coating-thickness-gages-and-inspection-instruments.html>).

Para o estudo da adesão dos filmes de TiN utilizou-se o equipamento da Defelsko modelo PosiTest AT-A (diâmetro do pino 14 mm; pressão de arrancamento máxima 40 MPa; resolução 0.01 MPa; precisão $\pm 1\%$ da escala completa)). A força foi aplicada na direção normal na interface filme-substrato relativamente ao plano do substrato a uma velocidade uniforme de 1 MPa/S2.

Foram usadas 8 chapas de aço com os revestimentos em estudo (TiN e Zr/ZrCN/TiN), duas chapas de titânio com o revestimento de multicamadas (Zr/ZrCN/TiN) e uma para o TiN, de forma a testar a adesão num substrato idêntico ao dos implantes e aditamentos protéticos.

A cola usada no teste foi EP11HT Gray com tempo de cura recomendado de 24 a 48 horas ou após um tratamento de 2 horas a 65°.

5.6.4. TESTES BIOLÓGICOS

Estes testes visam esclarecer os parâmetros biológicos dos revestimentos em estudo e avaliar a biocompatibilidade e interação celular.

5.6.4.1. TESTE DE CITOTOXICIDADE

O teste de citotoxicidade *in vitro* é classificado segundo a *International Standard Organization*, ISO 10993-1, como o teste de avaliação inicial para aferir a biocompatibilidade de materiais para uso em dispositivos médicos. Para a realização deste teste seguiu-se o seguinte protocolo laboratorial:

Meio de cultura: DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma-Aldrich #D5030) suplementado com 1.0 g/L D-glucose (Gibco, #15023-021), 3.7 g/L bicarbonato de sódio (Sigma-Aldrich, #S5761), 1% GlutaMAX™ (L-alanyl-L-glutamine dipeptide, Life Technologies, #35050-038), 1% piruvato de sódio (Gibco, #11360039), penicilina (100U/ml) e estreptomicina (100 µg/mL) (Invitrogen, #15140122), 10% FBS (Soro Fetal Bovino, Invitrogen, #10270106).

D0 – Preparação do extrato

1. Colocação dos materiais em estudo em microtubos em contacto com o meio de cultura não suplementado com FBS.
2. Colocação em estufa a 37° com agitação orbital (48h)

D1 – Sementeira

3. Observar os frascos T25 de cultura com células Vero ao microscópio ótico e verificação da densidade celular (determinação do grau de confluência das células e confirmação de ausência de contaminação microbiana e fúngica).
4. Tripsinização (libertação das células do frasco de cultura T25 e dissociação dos aglomerados de células).
 - 4.1. Remoção do meio de cultura com uma pipeta, tendo o cuidado de inverter o frasco para não tocar na camada de células com a ponta da pipeta.
 - 4.2. Lavar a camada de células com tampão fosfato salino (PBS) usando um volume igual ao meio de cultura usado.
 - 4.3. Pipetar a tripsina: 0,5 ml de tripsina por cada 25 cm² de área de cultura. Inclinar o frasco ligeiramente para espalhar a tripsina sobre todas as células.
 - 4.4. Colocar o frasco de cultura a 37 °C durante 5 ou 6 min na incubadora.
 - 4.5. Examinar as células novamente ao microscópio invertido para certificar que as células se destacaram e estão em suspensão. As paredes laterais do frasco de cultura podem ser levemente percutidas para ajudar a libertar as células ainda aderidas.
5. Contagem de células.

- 5.1. Retirar 50 a 100 μ l de suspensão de células para um microtubo.
- 5.2. Adicionar igual quantidade de azul tripano (fator de diluição 2) e misturar.
- 5.3. Limpar o hemocitómetro. Humedecer as bordas de uma lamela e colocá-la sobre o hemocitómetro.
- 5.4. Encher as duas câmaras de contagem do hemocitómetro com a suspensão celular (cerca de 8 a 10 μ l em cada câmara) e observar ao microscópio invertido com contraste de fase usando uma ampliação de 10x.
- 5.5. Contar o número de células viáveis (pequenos círculos brilhantes).

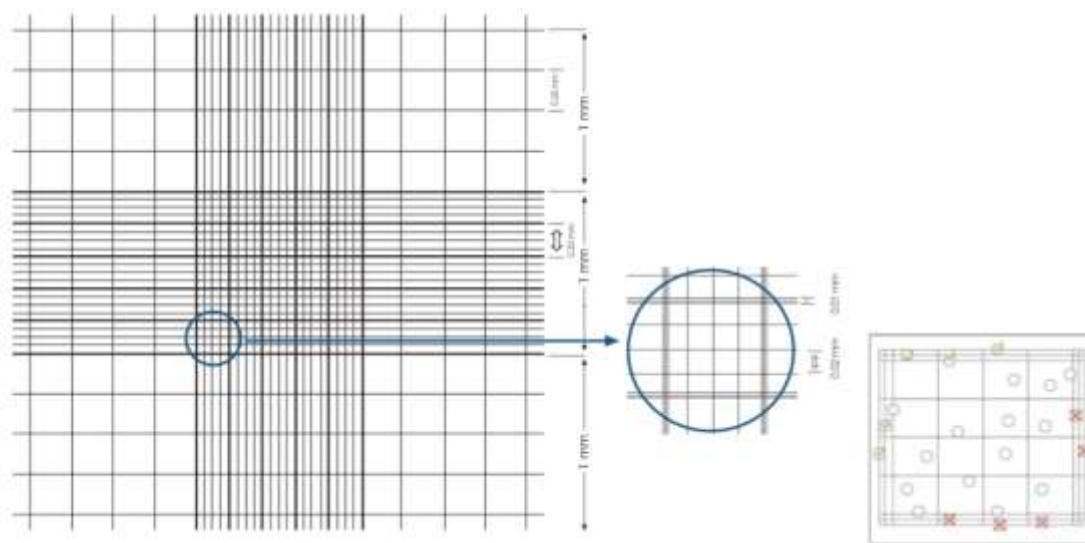


Figura 13: Câmara de Neubauer para contagem de células. As quadrículas são usadas para fazer a contagem e determinar a concentração de células na alíquota e calcular a concentração de células na suspensão celular (do qual foi tirada a alíquota) (adaptado de https://wiki2.org/es/Archivo:Reticulo_Neubauer_jpg).

6. Calcular a concentração de células viáveis no meio.
7. Calcular o número de células e de volume de meio necessário preparar para 60 poços (da placa de 96) em que se irão semear células.
8. Calcular o volume de meio com células necessário retirar do tubo onde estas se encontram em suspensão para outro tubo (onde iremos preparar a suspensão a semear) de modo a transferir o número de células calculado.
9. Transferir esse volume.
10. Adicionar ao tubo para onde foram transferidas as células o volume de meio fresco necessário de modo a perfazer o volume total calculado.
11. Pipetar 0,1 ml de meio com células para cada um dos poços onde se encontram os materiais.

12. Pipetar 0,1 ml nos 5 poços de controlo positivo aos quais se irá adicionar DMSO (Dimetilsulfóxido) correspondente a 10% do volume de meio.
13. Pipetar 0,1 ml nos 5 poços de controlo negativo meio fresco.
14. Observar ao microscópio e colocar na incubadora (48h).

D2 – Colocação do extrato

15. Aspiração do meio.
16. Colocação do extrato suplementado com FBS em 5 poços (primeira fila)
17. Colocação do extrato nos 5 poços da segunda fila: 0,5 ml meio de extrato + 0,5 ml de meio - cada poço recebe 0,1 ml desta mistura.
18. Fizeram-se 4 diluições para averiguar, em caso de citotoxicidade, a que percentagem o extrato deixaria de ser citotóxico
19. Colocar na incubadora a 37 °C (48h)

D4 – Avaliação da viabilidade celular para determinar a citotoxicidade.

20. Aspiração do meio.
21. Colocar 0,1 ml de solução de resazurina (90% de meio completo + 10% de resazurina a 0,2 mg/ml em PBS) em cada poço.
22. Deixar incubar a 37 °C durante 3 horas.
23. Leitura da absorvância no leitor de microplacas e determinação da citotoxicidade.



Figura 14: Leitor de microplacas usado na leitura da absorvância (disponível em <http://www.directindustry.com/pt/prod/biotek-instruments/product-34307-615728.html>).

5.6.4.2.ADESÃO E PROLIFERAÇÃO CELULAR

A análise das interações entre as células e o substrato é fundamental para a determinação das propriedades biológicas dos implantes. A capacidade de adesão das células ao substrato interfere na viabilidade celular, proliferação e morfologia. Este teste permite-nos inferir sobre o potencial do substrato como biomaterial e osteointegrante.

O uso da nanotecnologia na área de biomateriais permite a obtenção e avaliação de materiais sintéticos que mimetizam as nano-características dos tecidos, o que permite acelerar os processos de adesão e proliferação celular. A superfície de um substrato e as características inerentes podem definir a adesão ou não de diferentes organismos e os mecanismos envolvidos. Para realização deste teste seguiu-se o seguinte protocolo laboratorial:

D0 – Sementeira

1. Observar os frascos T25 de cultura com células Saos-2 ao microscópio ótico e verificação da densidade celular (determinação do grau de confluência das células e confirmação de ausência de contaminação microbiana e fúngica).
2. Tripsinização (libertação das células do frasco de cultura T25 e dissociação dos aglomerados de células).
 - 2.1. Remoção do meio de cultura com uma pipeta, tendo o cuidado de inverter o frasco para não tocar na camada de células com a ponta da pipeta.
 - 2.2. Lavar a camada de células com PBS usando um volume igual ao meio de cultura usado.
 - 2.3. Pipetar a tripsina: 0,5 ml de tripsina por cada 25 cm² de área de cultura. Inclinando o frasco ligeiramente para espalhar a tripsina sobre todas as células.
 - 2.4. Colocar o frasco de cultura a 37 °C durante 5 ou 6 minutos na incubadora.
 - 2.5. Examinar as células novamente ao microscópio invertido para certificar que as células se destacaram e estão em suspensão. As paredes laterais do frasco de cultura podem ser levemente percutidas para ajudar a libertar as células ainda aderidas.
3. Contagem de células.
 - 3.1. Retirar 50 a 100 µl de suspensão de células para um microtubo.
 - 3.2. Adicionar igual quantidade de azul tripano (fator de diluição 2) e misturar.
 - 3.3. Limpar o hemocítmetro. Humedecer uma lamela e colocá-la sobre o hemocítmetro.
 - 3.4. Encher as duas câmaras de contagem do hemocítmetro com a suspensão celular (cerca de 8 a 10 µl em cada câmara) e observar ao microscópio invertido com contraste de fase usando uma ampliação de 10x.
 - 3.5. Contar o número de células viáveis (pequenas esferas brilhantes).
4. Calcular a concentração de células viáveis no meio.

5. Calcular o número de células e do volume de meio necessário preparar para 12 poços (numa placa de 24) em que se irão semear células.
6. Calcular o volume de meio com células necessário retirar do tubo onde estas se encontram em suspensão para outro tubo (onde iremos preparar a suspensão a semear) de modo a transferir o número de células calculado.
7. Transferir esse volume.
8. Adicionar ao tubo para onde foram transferidas as células o volume de meio fresco necessário de modo a perfazer o volume total calculado.
9. Pipetar 0,8 ml de meio com células para cada um dos poços onde se encontram os materiais.
10. Observar ao microscópio e colocar na incubadora.

D1/D3/D5/D7 – Avaliação da viabilidade celular para determinar a taxa de adesão e proliferação celular.

11. Transferir as amostras para poços vazios de modo a separar as populações de células aderidas aos biomateriais e ao fundo dos poços.
12. Aspiração do meio.
13. Colocar 0,8 ml de solução de resazurina (90% de meio completo + 10% de resazurina 0,2 mg/ml em PBS) em cada poço.
14. Deixar incubar a 37 °C durante 3 horas.
15. Leitura da absorvância no leitor de microplacas e determinação da taxa de adesão ao substrato (D1) e taxa de proliferação (D3, D5, D7 e D9).

Neste teste *in vitro*, usamos a resazurina, corante azul não fluorescente, como indicador de viabilidade celular. A resazurina é reduzida a resorufina, composto cor de rosa e fluorescente, pelas células metabolicamente ativas.



Figura 15: Redução da resazurina a resorufina (disponível em <http://file.biotoool.com/downloads/Vita-Blue-Cell-Viability-Reagent.pdf>).

A alteração da cor do meio pode ser determinada por medição da variação da absorvância. Esta variação é proporcional ao número de células viáveis presentes.

O gráfico que se segue mostra os espectros de absorvância da resazurina (cujo pico de absorvância ocorre a 601 nm) e da resorufina (possui o máximo de absorvância a 571 nm).

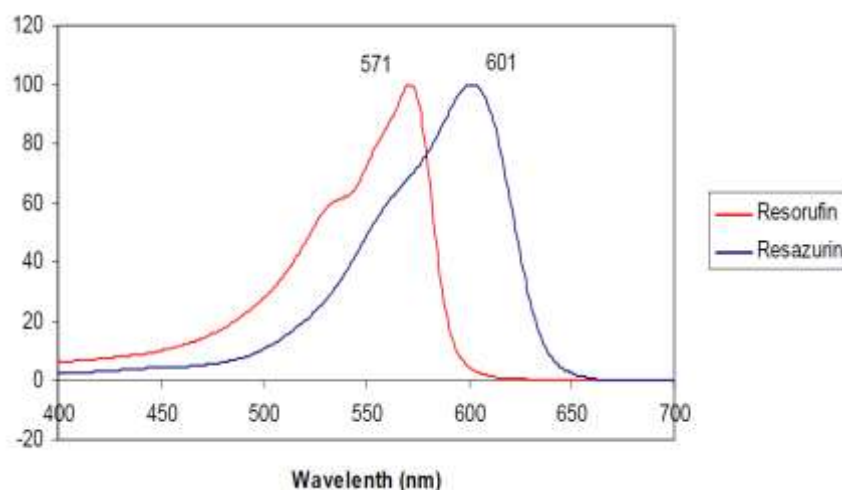


Figura 16: Espectros de absorvância da resazurina e da resorufina (disponível em <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/PrestoBlueFAQ.pdf>).

Dentro de certos limites (densidade celular e tempo de incubação), a conversão de resazurina em resorufina é proporcional ao número de células metabolicamente ativas. A leitura da absorvância é feita no D1, D3, D5, D7 e D9.

5.6.4.3.FOSFATASE ALCALINA – ALP

A fosfatase alcalina é uma enzima que se pode encontrar em diversos tecidos do corpo, com concentrações superiores no fígado e nos ossos.

A isoforma óssea encontra-se na membrana plasmática dos osteoblastos e está envolvida no processo de formação e mineralização dos ossos. É usada como marcador precoce da mineralização da matriz do colagénio e responsável pela regeneração óssea.

Para realização deste teste seguiu-se o protocolo de coloração para a fosfatase alcalina:

1. Preparação de soluções e reagentes.

1.1. Preparação da solução de Naftol AS-MX Fosfato/N,N Dimetilformamida (DMF) :

- Naftol AS-MX Fosfato: 5 mg

- DMF: 0,25 ml
- 1.2. Misturar para dissolver.
- 1.3. Colocar no frigorífico.
- 1.4. Preparação da solução tampão Tris-ácido clorídrico, pH 8,74:
 - Tris 0,2 M (2,42 g Tris Base / 100 ml): 10 ml
 - Ácido clorídrico 0,1 M (HCl): 4 ml
 - Água destilada: 26 ml
- 2. Para preparar 1 ml de solução de trabalho:
 - 2.1. Pesar 0,6 mg de sal de diazónio (sal LB vermelho violeta rápido)
 - 2.2. Adicionar 0,5 ml de solução tampão Tris, pH 8,74
 - 2.3. Adicionar 0,5 ml de água destilada
 - 2.4. Misturar
- 3. Adicionar 5 µl de solução Naftol AS-MX Fosfato/(DMF).
- 4. Detecção de células:
 - 4.1. Lavar a cultura 2 vezes com PBS.
 - 4.2. Fixar a cultura durante 10 minutos usando paraformaldeído a 4%.
 - 4.3. Lavar 2 vezes com PBS
 - 4.4. Adicionar a solução de trabalho (cerca de 100 µl por amostra).
 - 4.5. Incubar durante 15 minutos.
 - 4.6. Lavar com água destilada, secar e observar no microscópio ótico.

4.6.1.1. ANÁLISE DA MORFOLOGIA – IMUNOFLUORESCÊNCIA

A fluorescência (forma de luminescência) é um dos fenómenos físicos mais utilizados em microscopia biológica e analítica, principalmente pela sua alta sensibilidade e especificidade.

A imunofluorescência (IF) é uma técnica de laboratório que consiste no uso de anticorpos específicos que foram conjugados quimicamente com corantes fluorescentes, podendo os anticorpos marcados ligar-se direta ou indiretamente aos antígenos celulares. Esta técnica possui distintas aplicações biológicas, incluindo avaliação de células em suspensão, células cultivadas, tecidos, grânulos, análise morfológica, entre outras.

O corante fluorescente é submetido a luz com um comprimento de onda na gama de excitação do fluoróforo. A fluorescência emitida tem uma energia menor do que a luz

absorvida, de modo que o comprimento de onda da luz emitida é maior que o da luz de excitação.

A IF secundária ou indireta usa dois anticorpos: o primeiro anticorpo (primário) não marcado liga-se especificamente à molécula alvo, e o anticorpo secundário, que transporta o fluoróforo, reconhece o anticorpo primário e dá-se a ligação. Os múltiplos anticorpos secundários podem ligar-se a um único anticorpo primário, fornecendo amplificação de sinal e aumentando o número de moléculas de fluoróforo por antígeno.

Este protocolo é mais complexo e demorado do que o protocolo primário (ou direto), mas permite maior flexibilidade porque uma variedade de diferentes anticorpos secundários e técnicas de detecção podem ser usados para um determinado anticorpo primário.

O microscópio de epifluorescência usado para realização do projeto foi o modelo Nikon Eclipse Ti-S.

Para realização deste teste seguiu-se o protocolo de imunofluorescência indireta:

1. Fixação

1.1. Lavar as células duas vezes com PBS aditivado com cálcio e magnésio.

1.2. Fixação das células, incubando-as em paraformaldeído a 4% (VV) em PBS durante 15 minutos à temperatura ambiente.

1.3. Lavar as células duas vezes com PBS

2. Permeabilização

2.1. Incubar as amostras durante 10 minutos com PBS contendo 0,2% de Triton X-100

2.2. Lavar as células com PBS

3. Bloqueio

3.1. Incubar as células com 1% de albumina de soro bovino (BSA), 22,52 mg/ml de glicina em PBST (PBS + 0,1% *Tween* 20) durante 45 minutos para bloquear a ligação inespecífica dos anticorpos.

3.2. Lavar as células com PBS.

4. Imunomarcção

4.1. Incubar as células com o anticorpo diluído em 1% de BSA em PBST num ambiente humidificado na câmara durante 2h à temperatura ambiente ou durante a noite a 4 °C.

4.2. Lavar as células duas vezes com PBS, 2 minutos cada lavagem.

- 4.3. Incubar as células com o anticorpo secundário em 1% de BSA durante 1,5 h à temperatura ambiente, no escuro.
- 4.4. Aspirar a solução de anticorpo secundário e lavar três vezes com PBS, 2 minutos cada.
5. Citoesqueleto – marcação da actina filamentar
 - 5.1. Adicionar 100 µl de 100 nM *Acti-stain* 555 Faloidina.
 - 5.2. Incubar à temperatura ambiente, no escuro, durante 30 minutos.
 - 5.3. Lavar duas vezes em PBS.
6. Marcação nuclear
 - 6.1. Adicionar 100 µl de DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) 300 nM em PBS.
 - 6.2. Incubar à temperatura ambiente, no escuro, durante 5 minutos.
 - 6.3. Lavar com PBS
7. Observar e fotografar ao microscópio de epifluorescência Nikon TiS (fonte de luz de mercúrio e bloco de filtros adequado).

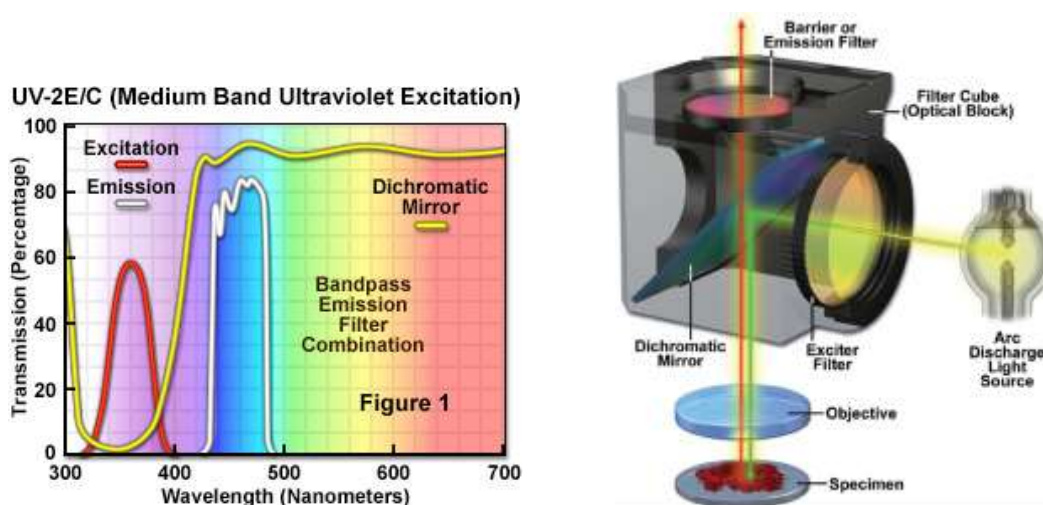


Figura 17: Especificações do filtro de excitação ultravioleta UV-2E/C e respectivos comprimentos de onda (adaptado de <http://www.bwoptics.com/newsend2.asp?id=5>).

Especificações do filtro de excitação ultravioleta UV-2E/C: (Ver anexo IV)

- Comprimento de onda do Filtro de Excitação: 340-380 nm (bandpass, 360 CWL)
- Comprimento de onda do Espelho Dicromático: 400 nm (longpass, LP)
- Comprimento de onda do Filtro de Emissão: 435-485 nm (bandpass, 460 CWL)

Tabela 4: Especificações dos anticorpos e marcadores utilizados.

Anticorpo Primário de Vinculina 1: 100, 100µl	Anticorpo Secundário de Vinculina 1: 400, 80 µl	Marcador Citoesqueleto	Marcador Nuclear
Anti-Vinculin antibody, Mouse monoclonal, clone hVIN-1, purified from hybridoma cell culture Product Number V9264, Sigma-Aldrich	Goat anti-Mouse IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488 Cat. # A-11001, Molecular Probes, Thermo Fisher Scientific.	Acti-stain™ 555 Phalloidin Fluorescent Cat. # PHDH1, Cytoskeleton, Inc.	DAPI (4', 6-Diamidino-2-Phenylindole, Dilactate) Cat # D3571, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific.

VI. RESULTADOS

6.1. ANÁLISE DA SUPERFÍCIE

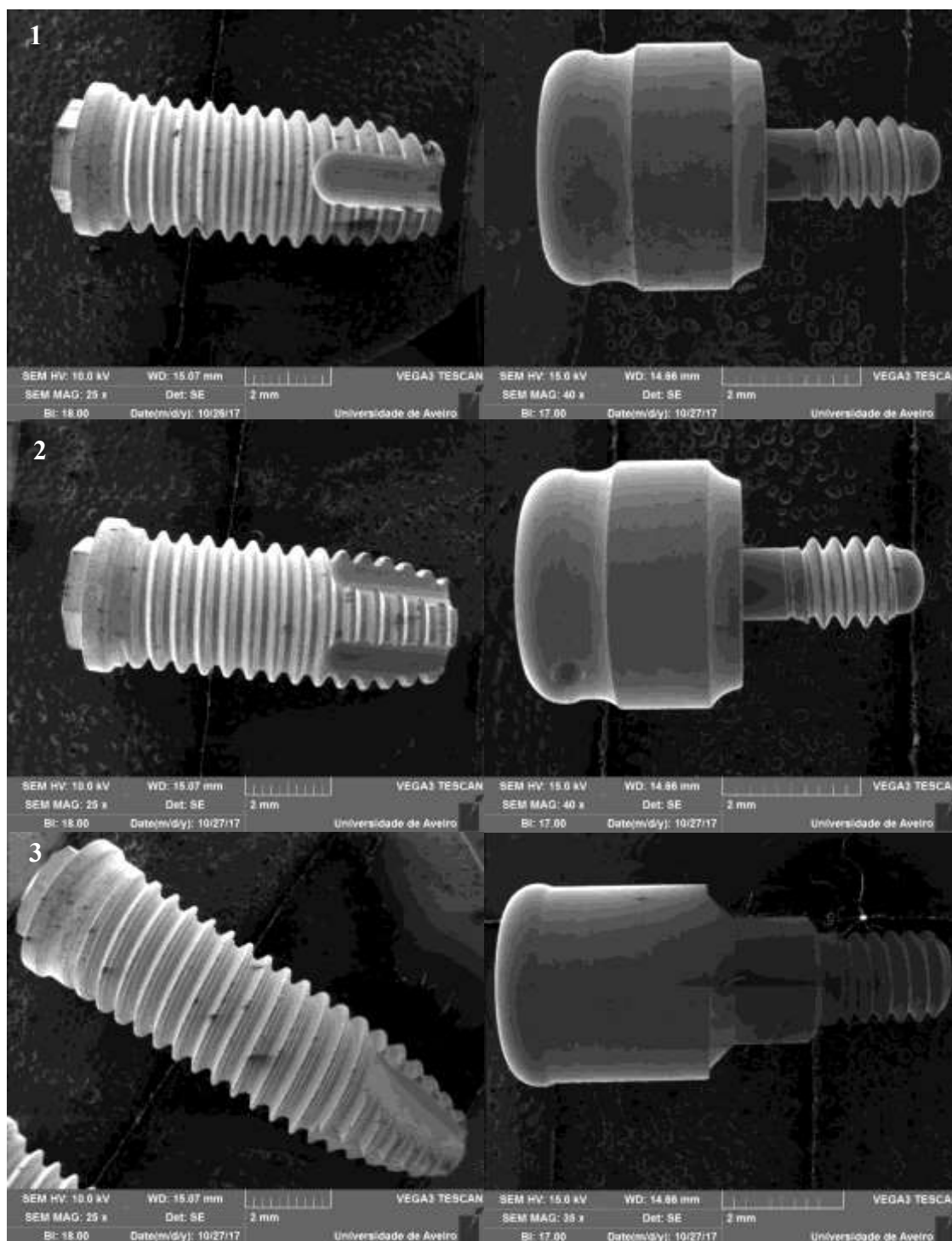


Figura 18: Micrografias dos implantes e dos aditamentos protéticos com ampliação de 25 x: monocamada de TiN (1), multicamada Zr/ZrCN/TiN (2) e comercial (3).

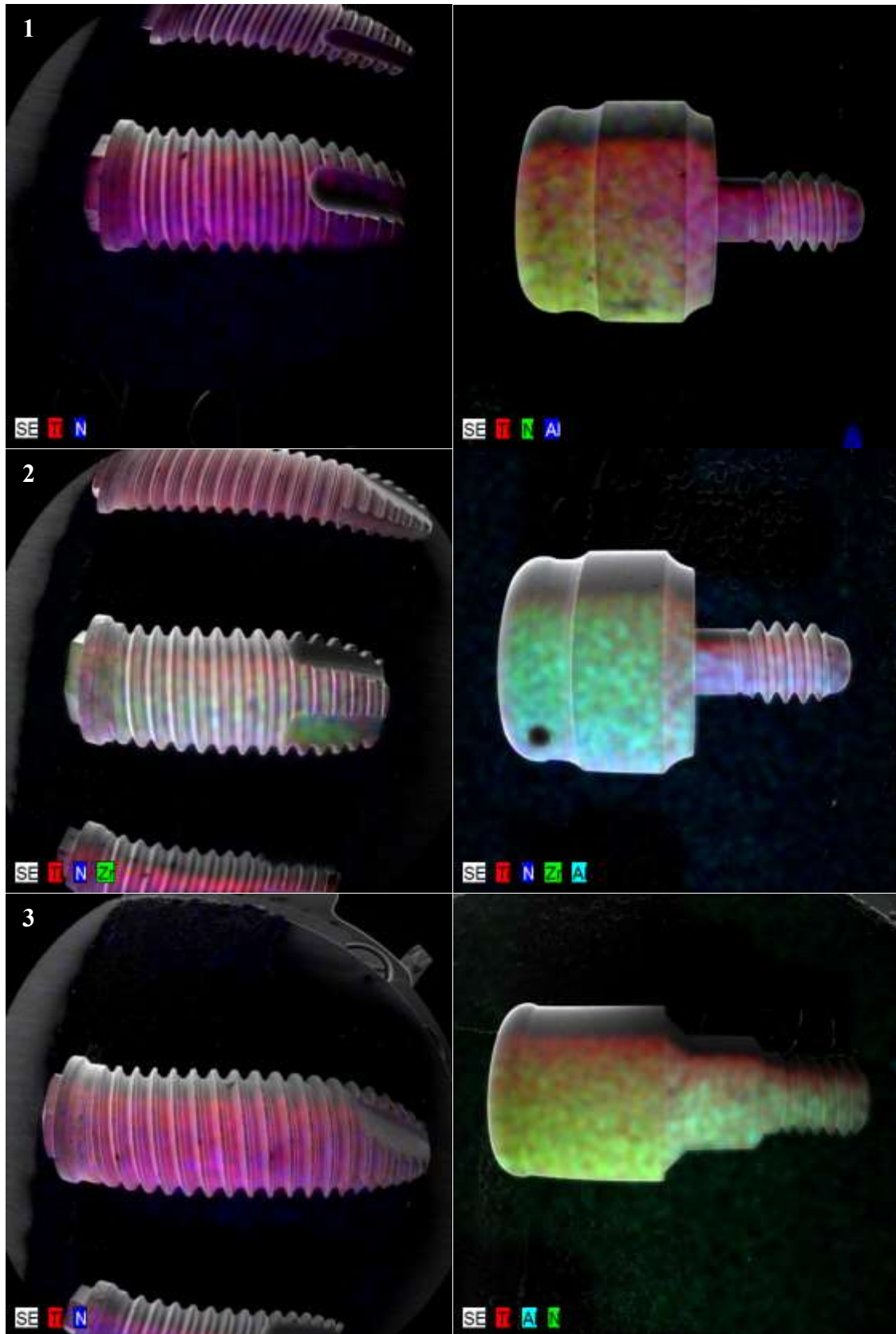


Figura 19: Mapeamento de EDXS dos implantes e aditamentos protéticos: monocamada de TiN (1), multicamada Zr/ZrCN/TiN (2) e comercial (3).

A avaliação morfológica foi feita através do Microscópio Eletrônico de Varrimento, onde foram observados: um implante HI-TEC Implants® com revestimento de TiN e um com revestimento de Zr/ZrCN/TiN, um implante Exaktus® Cilíndricos Biodent HEX RP comercial, um aditamento protético Exaktus® Kerator BHI comercial e dois aditamentos protéticos Tipo Locator revestidos com TiN e Zr/ZrCN/TiN. Foram ainda analisados os revestimentos depositados em substratos de silício.

Através da técnica de DRX foram analisadas as amostras de TiN e Zr/ZrCN/TiN, revestidas na *Prirev*. No espectro de difração de raio-X, representado na figura 18, observou-se que ambas as amostras apresentam uma estrutura cristalina com picos de difração correspondentes às diferentes fases observadas.

O espectro de difração de raio-X, referente às amostras de TiN e Zr/ZrCN/TiN, depositado no silício, revela uma estrutura cristalina dos filmes. A amostra TiN, representada pela linha a vermelho, apresenta duas fases: uma de estrutura cúbica, referente ao Nitreto de Titânio, com picos localizados a $\theta=36,2^\circ$ (111), $\theta=42,0^\circ$ (200), $\theta=61,0^\circ$ (220) e a $\theta=73,0^\circ$ (311), segundo a Carta JCPDS No.: 04-017-6803 e outra, hexagonal, referente ao Titânio, com um pico localizado a $\theta=54,0^\circ$ (102), segundo a Carta JPCDS No.: 04-018-6622. Esta amostra apresenta ainda um pico localizado a $\theta=55,4^\circ$ (400), referente ao silício (substrato), segundo a Carta JPCDS No.: 01-078-7300 (conforme os anexos VI, VII e X).

A amostra Zr/ZrCN/TiN, representada pela a linha a preto, apresenta quatro fases: uma estrutura cúbica, referente ao carbonitreto de zircónio, com picos localizados a $\theta=33,5^\circ$ (111), $\theta=38,8^\circ$ (200), $\theta=56,1^\circ$ (220), $\theta=66,9^\circ$ (311) e a $\theta=70,3^\circ$ (222), segundo a Carta JCPDS No.: 04-001-6512; uma hexagonal, referente ao Zircónio, com um pico localizado a $\theta=31,9^\circ$ (100), segundo a Carta JPCDS No.: 04-004-6798; uma cúbica, referente ao Nitreto de Titânio, com um pico localizado a $\theta=36,2^\circ$ (111), $\theta=42,0^\circ$ (200), $\theta=61,0^\circ$ (220) e a $\theta=73,0^\circ$ (311), segundo a Carta JCPDS No.: 04-017-6803 e ainda, uma fase com estrutura hexagonal, referente ao Titânio, com localização a $\theta=54,0^\circ$ (102), segundo a Carta JCPDS No.: 04-018-6622 (conforme os anexos VII, VIII, IX e X).

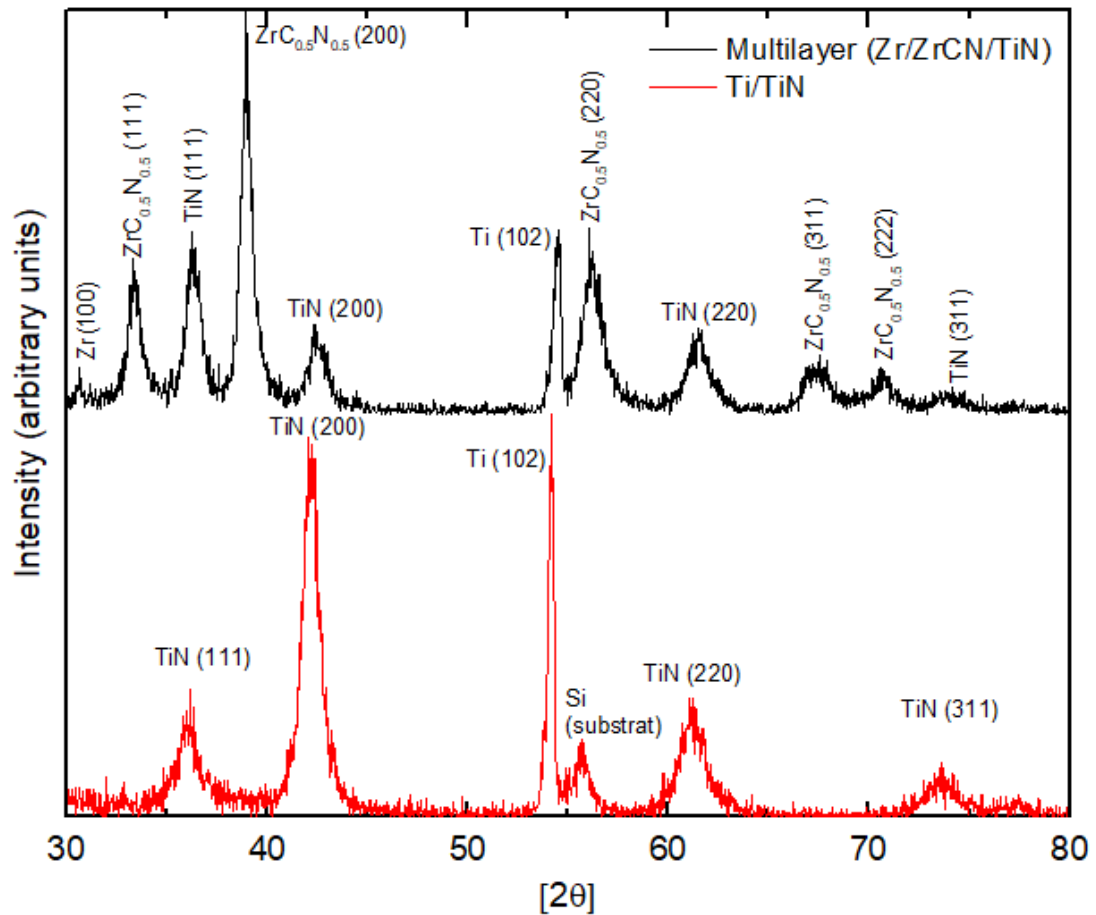


Figura 20: Espectro de difração raio-X por ângulo rasante dos filmes TiN e Zr/ZrCN/TiN, depositados num substrato de silício.

A figura seguinte mostra a espessura dos filmes analisados. Verifica-se que o filme monocamada TiN apresenta uma estrutura de 400 a 500 nm e o multicamada Zr/ZrCN/TiN 950 a 1000 nm.

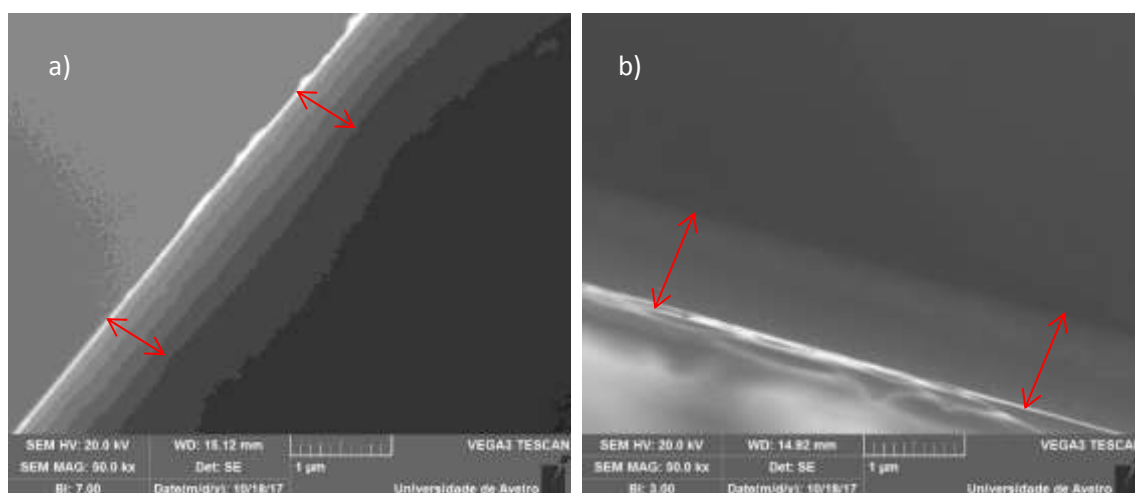


Figura 21: Micrografias dos filmes depositados. a) TiN e b) Zr/ZrCN/TiN, depositados num substrato de silício.

As micrografias seguintes mostram uma deposição que poderá ser considerada, a nível macroscópico, uniforme, tendo sido, contudo, observada a existência de porosidade aberta com poros na ordem de $2\ \mu\text{m}$, assim como de macropartículas de dimensões superiores a $100\ \text{nm}$. Em relação à porosidade, esta poderá ser devida a uma das desvantagens deste método que é a deposição de macropartículas com elevadas dimensões, que não ficam fisicamente agregadas ao restante filme, e que, no final do processo, apenas se observa o local onde ficaram provisoriamente alojadas. O que se observou no revestimento multicamada (figura 23) é semelhante ao obtido para o monocamada.

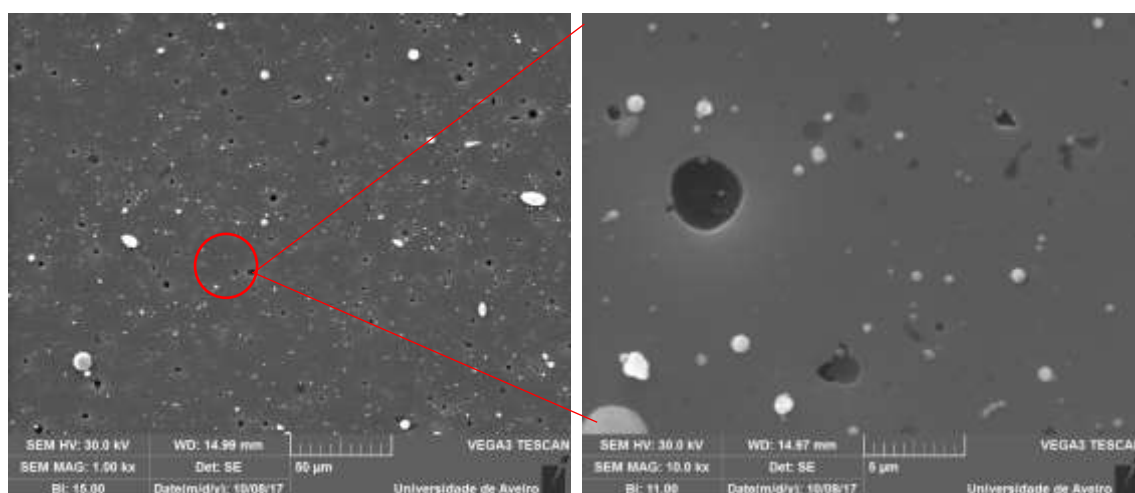


Figura 22: Micrografias do filme de TiN a duas ampliações 1 kx e 10 kx, depositados num substrato de silício.

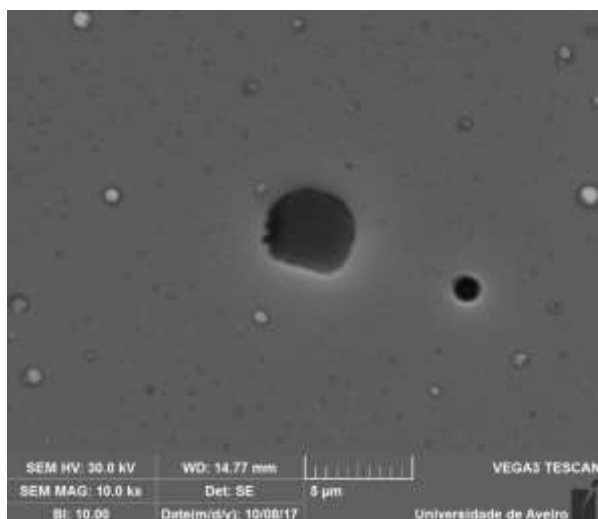


Figura 23: Micrografias do filme de Zr/ZrCN/TiN a 10 kx, depositado num substrato de silício.

No filme de TiN, o EDXS mostrou apenas a existência de Ti na estrutura o que corrobora os resultados do DRX. A distribuição dos átomos de titânio é muito homogênea com a exceção dos poros, como mostra a figura abaixo apresentada. Para o caso do filme multicamada também se observa, pelo mapeamento, uma distribuição homogênea dos elementos, comprovando a existência de poros que atingem o substrato.

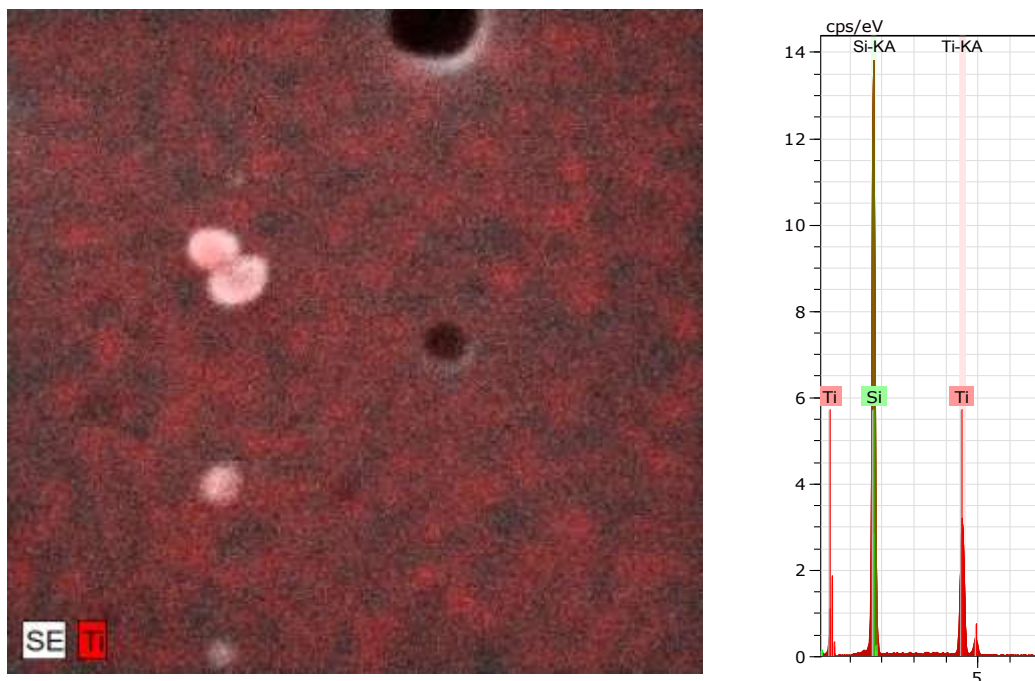


Figura 24: Mapeamento de EDXS e respetiva indexação elemental do filme de TiN, depositado num substrato de silício.

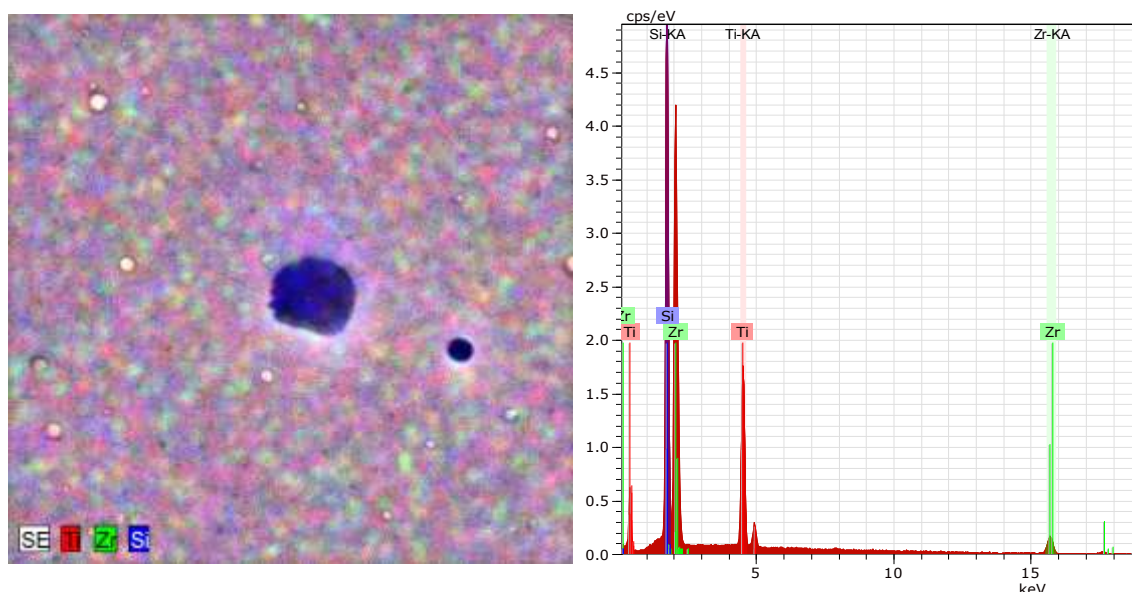


Figura 25: Mapeamento de EDXS e respetiva indexação elemental do filme de Zr/ZrCN/TiN, depositado num substrato de silício.

A deposição de TiN e de Zr/ZrCN/TiN, pela técnica de PVD, em implantes foi analisada estrutural e morfologicamente apresentando-se na figura seguinte o mapeamento de EDXS nessas amostras em locais cuja a geometria é mais complexa, no corpo do implante. Como se pode verificar, os resultados obtidos nas deposições mostram o esperado, isto é, uma distribuição homogênea dos elementos. Salientamos a deteção, em todas as amostras, inclusive, na de referência (sem qualquer deposição), de alumínio. Suspeitamos este elemento provém de um possível tratamento superficial ao implante após a sua maquinação.

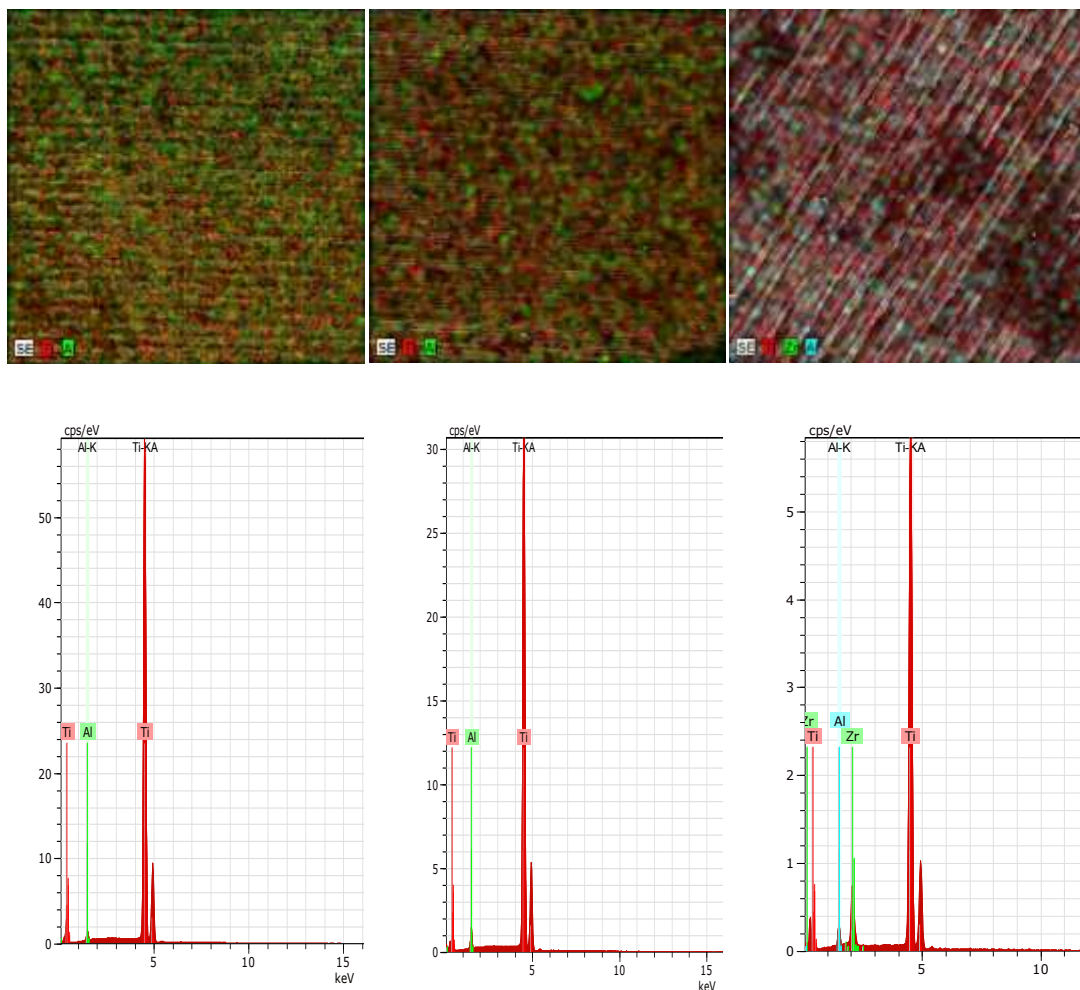


Figura 26: Mapeamento de EDXS e respetiva indexação elemental dos implantes HI-TEC Implants® sem deposição, com deposição de TiN e com deposição de Zr/ZrCN/TiN, respetivamente.

Na figura seguinte é feita a comparação microestrutural entre o implante com o filme de TiN e o implante comercial Exaktus® Cilíndricos Biodent HEX RP. Como se pode verificar, a grande diferença entre eles é a não deteção de alumínio no implante comercial, o que pode ser justificado por um tratamento de superfície diferente, por exemplo químico.

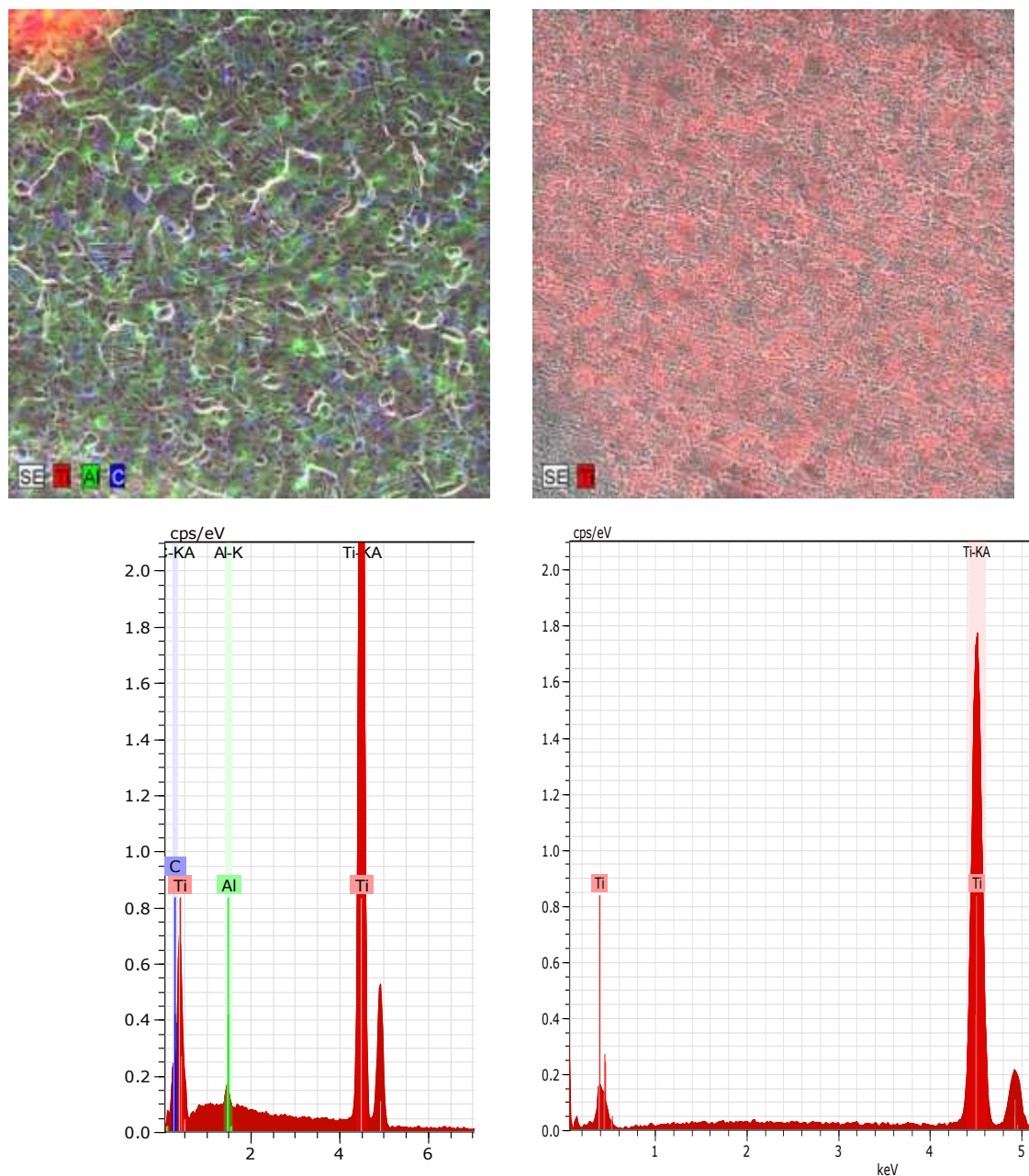


Figura 27: Mapeamento de EDXS e respetiva indexação elementar do implantes HI-TEC Implants® com deposição de TiN e do implante Exaktus® Cilíndricos Biodent HEX RP comercial, respetivamente.

A avaliação da rugosidade foi feita através do Perfilómetro Ótico, onde foram observados: um implante HI-TEC Implants® com revestimento de TiN e um com revestimento de Zr/ZrCN/TiN, um implante Exaktus® Cilíndricos Biodent HEX RP comercial, um aditamento protético Exaktus® Kerator BHI comercial e dois aditamentos protéticos Tipo Locator revestidos com TiN e Zr/ZrCN/TiN. Foram ainda observados os revestimentos depositados em substratos de silício.

No entanto, decidiu-se não apresentar os estudos de Perfilometria referentes aos aditamentos protéticos, uma vez que estes elementos estão apenas em contacto com os elementos mecânicos da prótese e o revestimento atual tem essencialmente uma função estética. Ainda assim, os valores médios de rugosidade são idênticos aos encontrados nos implantes estudados.

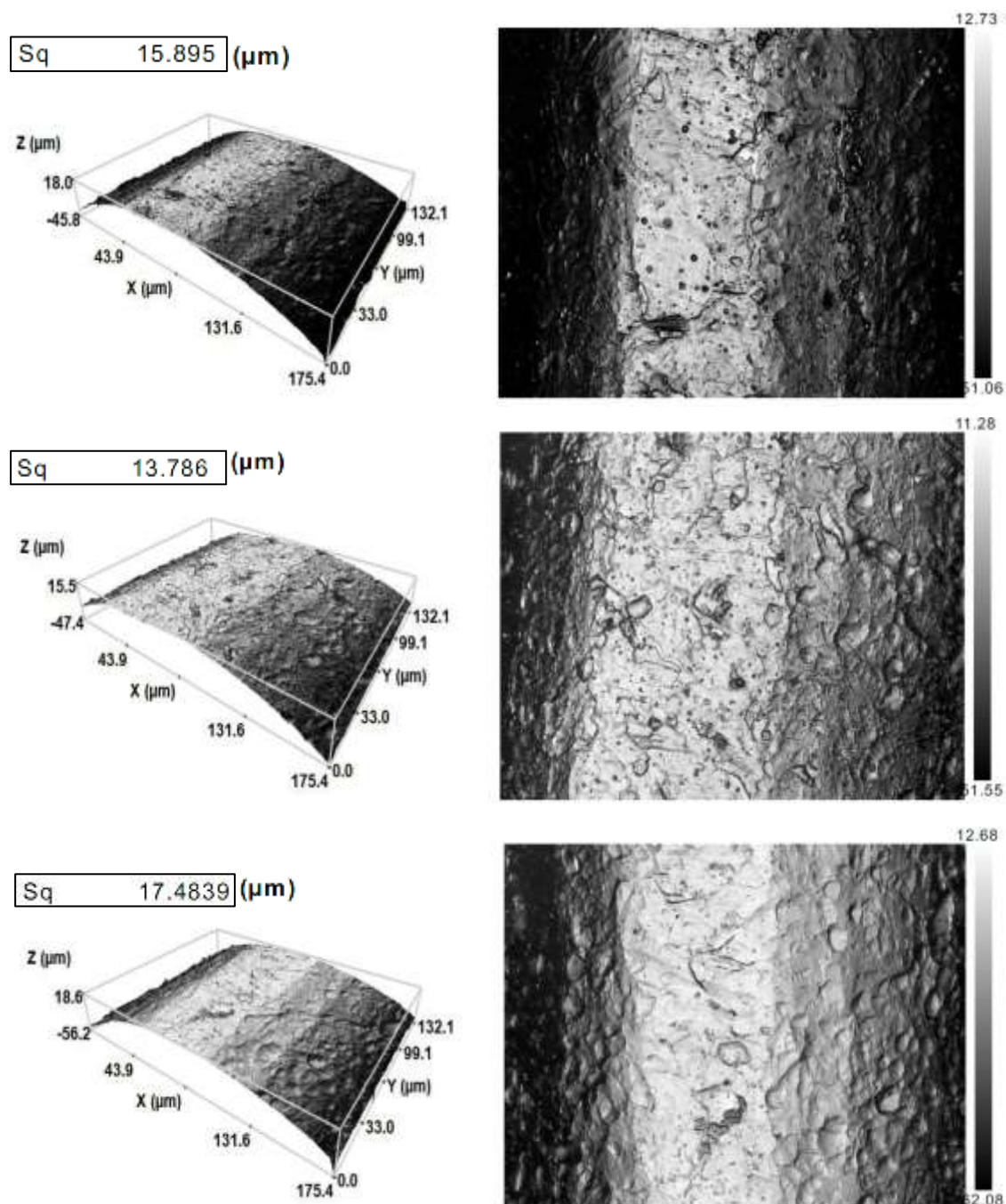


Figura 28: Resultados da Perfilometria referentes às amostras do implante HI-TEC Implants® com revestimento de TiN, do implante HI-TEC Implants® com o revestimento de Zr/ZrCN/TiN e do implante Exaktus® Cilíndricos Biodent HEX RP comercial.

Das imagens de Perfilometria referentes às amostras de silício, abaixo apresentadas, verifica-se rugosidades quadráticas médias superiores a 183 nm.

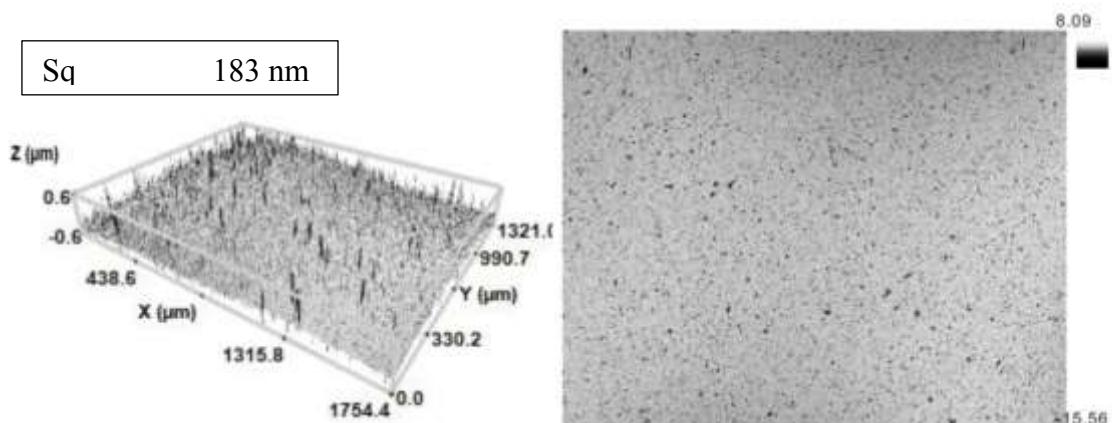


Figura 29: Resultados da Perfilometria referentes às amostras do silício com revestimento de TiN.

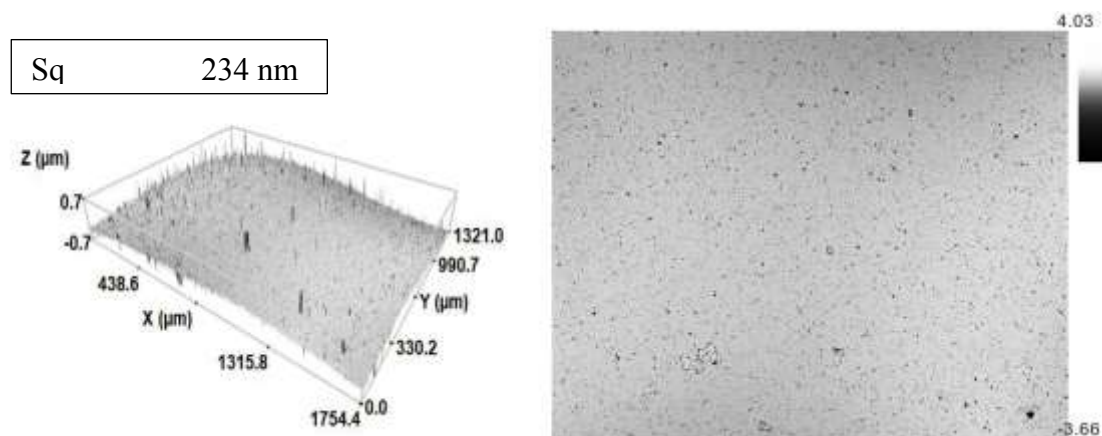


Figura 30: Resultados da Perfilometria referentes às amostras do silício com revestimento de Zr/ZrCN/TiN.

No estudo de Perfilometria aos revestimentos, no substrato de silício, observou-se a existência de porosidades abertas, assim como, uma rugosidade mais elevada no revestimento multicamadas Zr/ZrCN/TiN, do que a observada nos filmes de TiN, apresentado um valor médio de 234 nm. Estes resultados são expectáveis tendo em conta o tipo e espessura de filme depositado.

Para determinação da adesão foram testadas amostras com revestimento de TiN e revestimento de Zr/ZrCN/TiN, em chapa de aço-inox e chapa de titânio. Foram efetuadas 18 medições.

	<p>Pressão de arrancamento: <2 MPa</p> <p>Tipo de fratura: Falha da cola</p>		<p>Pressão de arrancamento: 2,6 MPa</p> <p>Tipo de fratura: Falha da cola (a) e adesiva (b).</p>
	<p>Pressão de arrancamento: <2 MPa</p> <p>Tipo de fratura: Falha da cola</p>		<p>Pressão de arrancamento: <2 MPa</p> <p>Tipo de fratura: Falha da cola</p>
	<p>Pressão de arrancamento: <2 MPa</p> <p>Tipo de fratura: Falha da cola</p>		<p>Pressão de arrancamento: 2,5 MPa</p> <p>Tipo de fratura: Falha da cola (a) e adesiva (b).</p>
	<p>Pressão de arrancamento: <2 MPa</p> <p>Tipo de fratura: Falha da cola</p>		<p>Pressão de arrancamento: 2,5 MPa</p> <p>Tipo de fratura: Falha da cola (a) e adesiva (b). (Titânio)</p>
	<p>Pressão de arrancamento: 3,3 MPa</p> <p>Tipo de fratura: Falha da cola (a) e adesiva (b). (Titânio)</p>		<p>Pressão de arrancamento: 2,0 MPa</p> <p>Tipo de fratura: Falha da cola (a) e adesiva (b). (Titânio)</p>

Figura 31: Resultados obtidos no teste de adesão para o revestimento de TiN (à direita) e Zr/ZrCN/TiN (à esquerda).

Dos ensaios de adesão do filme ao substrato verificou-se falha de cola a um valor mínimo de 2,2 MPa, o que significa que a adesão do filme ao substrato é superior a esse valor.

É de salientar que os melhores valores de pressão de arrancamento foram obtidos em filmes revestidos no substrato de titânio, comparativamente com a chapa de aço, o que é favorável à aplicação pretendida para o revestimento de TiN e Zr/ZrCN/TiN, dado os implantes comercializados também serem de titânio.

A força máxima usada em Medicina Dentária na colocação de um implante é de 37 a 45 N e a força mínima de arrancamento em fratura do tipo falha cola e adesiva é de 338 N, na chapa de titânio, o que nos permite trabalhar com margem de segurança na utilização destes revestimentos em implantes.

6.2. TESTES BIOLÓGICOS

6.2.1. TESTE DE CITOTOXICIDADE

Nenhum dos extratos das amostras estudadas apresentou citotoxicidade pelo fato da viabilidade celular relativa ser superior a 90% em todas as condições analisadas, particularmente na condição principal (concentração maior, sem diluição do extrato).

Uma vez que a condição principal não apresenta citotoxicidade, não é expectável que as condições secundárias, com as respectivas diluições, exibam efeitos citotóxicos.

Não tendo os extratos revelado citotoxicidade assume-se que o material não possui nenhum composto lixiviável potencialmente citotóxico.

Os resultados obtidos estão concordantes com o controlo negativo (meio fresco DMEM) para ambas as amostras. O material é potencialmente biocompatível, mas será necessário a realização de mais testes *in vivo* para inferir rigorosamente a biocompatibilidade.

Tabela 5: Resultados de viabilidade celular relativa ao controlo negativo obtidos no teste de citotoxicidade para os revestimentos em estudo.

Concentração do extrato	TiN	Zr/ZrCN/TiN	Controlo Positivo	Controlo Negativo
Original	0,95 ± 0,03	0,96 ± 0,03	0,05 ± 0,03	1,00 ± 0,03
Diluição 1	1,00 ± 0,04	1,01 ± 0,03		
Diluição 2	1,00 ± 0,04	0,99 ± 0,04		
Diluição 3	1,01 ± 0,03	1,01 ± 0,04		
Diluição 4	1,04 ± 0,03	1,02 ± 0,03		

6.2.2. ADESÃO E PROLIFERAÇÃO CELULAR

Nas taxas de adesão, em ambas as amostras, os resultados demonstraram uma adesão comparável ao controlo de células, o que revela que as células não têm qualquer dificuldade em interagir com o substrato nem em aderir à superfície e permanecer viáveis.

No que diz respeito à proliferação, os resultados obtidos foram idênticos ou até mesmo superiores ao do controlo de células, o que demonstra que as células não têm qualquer problema em proliferar, emigrar e ocupar toda a superfície formando uma camada confluenta tal como fazem no controlo.

Do ponto de vista do substrato, podemos concluir que é um bom substrato e que as células interagem com ele sem qualquer problema.

Tabela 6: Resultados do teste de Adesão e Proliferação Celular para as amostras de TiN, Zr/ZrCN/TiN, Controlo celular e, respetivos desvios padrão.

	TiN	Zr/ZrCN/TiN	CC
DIA 1	1,02	1,12	1,00
DIA 3	1,56	1,74	1,64
DIA 5	2,57	2,84	2,62
DIA 7	4,00	4,37	3,58

Desvio Padrão δ	TiN	Zr/ZrCN/TiN	CC
DIA 1	0,08	0,05	0,05
DIA 3	0,30	0,19	0,08
DIA 5	0,59	0,25	0,09
DIA 7	0,89	0,31	0,12

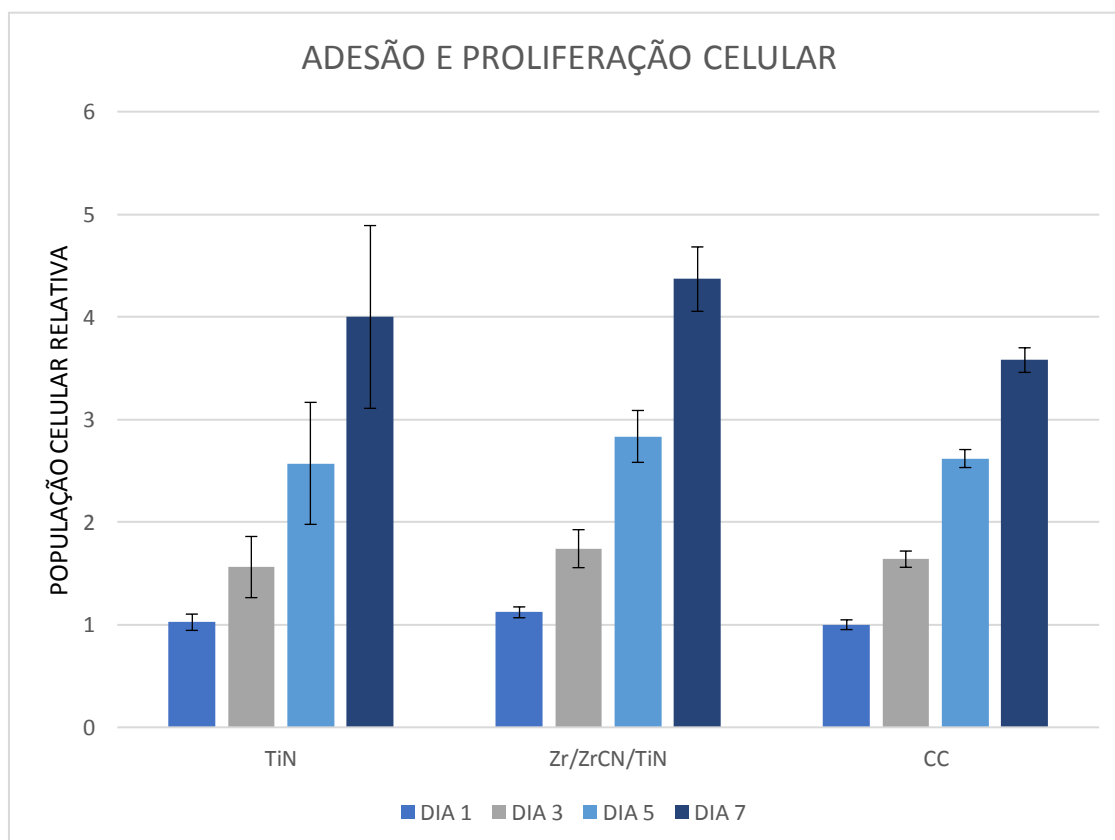


Figura 32: Esquematização gráfica dos resultados obtidos no teste de adesão e proliferação celular para as amostras de TiN, Zr/ZrCN/TiN, controlo celular e, respetivos desvios padrão.

6.2.3. FOSFATASE ALCALINA – ALP

Os resultados obtidos mostram que as células presentes na superfície do substrato estão a produzir a enzima (fosfatase alcalina) responsável pela mineralização da matriz de colagénio, em ambas as amostras.

O ambiente a que as células estão expostas (em contacto com o substrato) permite que continuem a expressar os genes característicos de uma célula osteoblástica, sendo propício o metabolismo dos mesmos.

Quanto à análise da intensidade da coloração vermelha devida à marcação da fosfatase alcalina, os resultados obtidos evidenciam uma razão de $1,51 \pm 0,05$ para as amostras de TiN e de $1,46 \pm 0,06$ para as amostras revestidas com Zr/ZrCN/TiN.

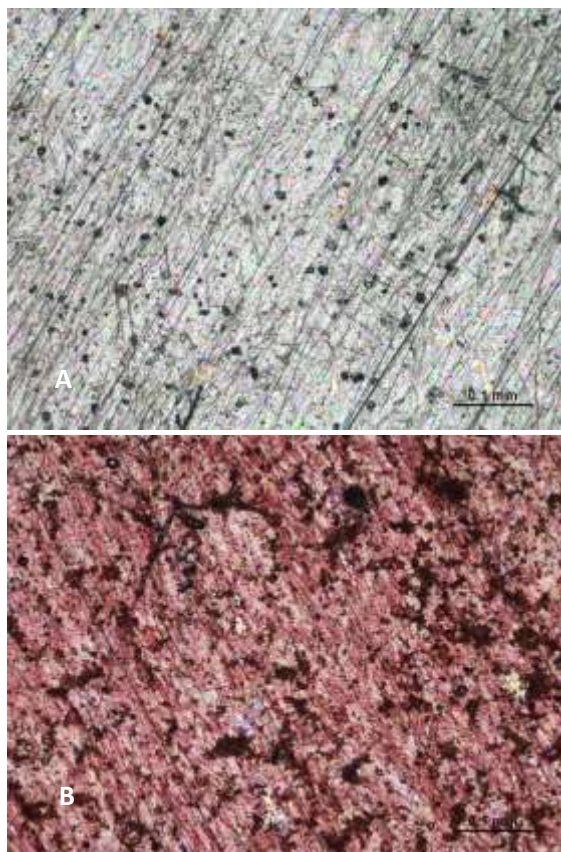


Figura 33: Resultados obtidos no teste ALP para as amostras de TiN. A figura (A) representa o controlo (células não marcadas) e a figura (B) representa a marcação da enzima presente nas células presentes aderidas à superfície da amostra em estudo.

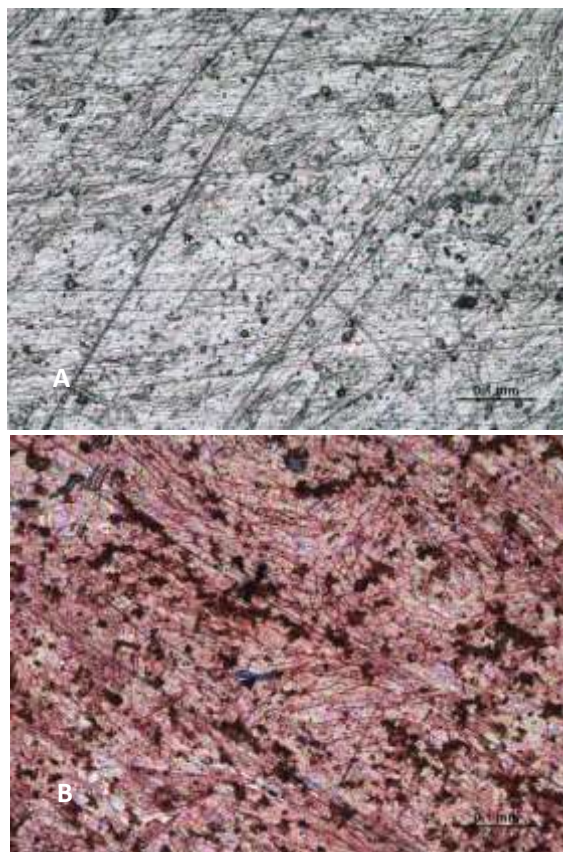


Figura 34: Resultados obtidos no teste ALP para as amostras de Zr/ZrCN/TiN. A figura (A) representa o controle (células não marcadas) e a figura (B) representa a marcação da enzima presente nas células aderidas à superfície da amostra em estudo.

A diferença de intensidade da cor, nos revestimentos testados, analisada com o teste *t Student*, mostra-se não significativa ($p=0,02$).

6.2.4. ANÁLISE DA MORFOLOGIA – IMUNOFLUORESCÊNCIA

Os resultados da análise morfológica, pela marcação de imunofluorescência, foram os expectáveis e similares em ambas as amostras de revestimento, TiN e Zr/ZrCN/TiN, quando comparadas com o controle. A adesão das células aos substratos é notória e homogênea. Observou-se a existência de adesões focais explícitas na periferia das células, bem evidenciadas pela marcação do citoesqueleto e da vinculina. Os extremos dos feixes de actina coincidem com as zonas mais intensas de marcação da vinculina que revela as zonas onde são formadas as adesões focais. É, ainda, evidente uma correta organização do citoesqueleto e do núcleo.

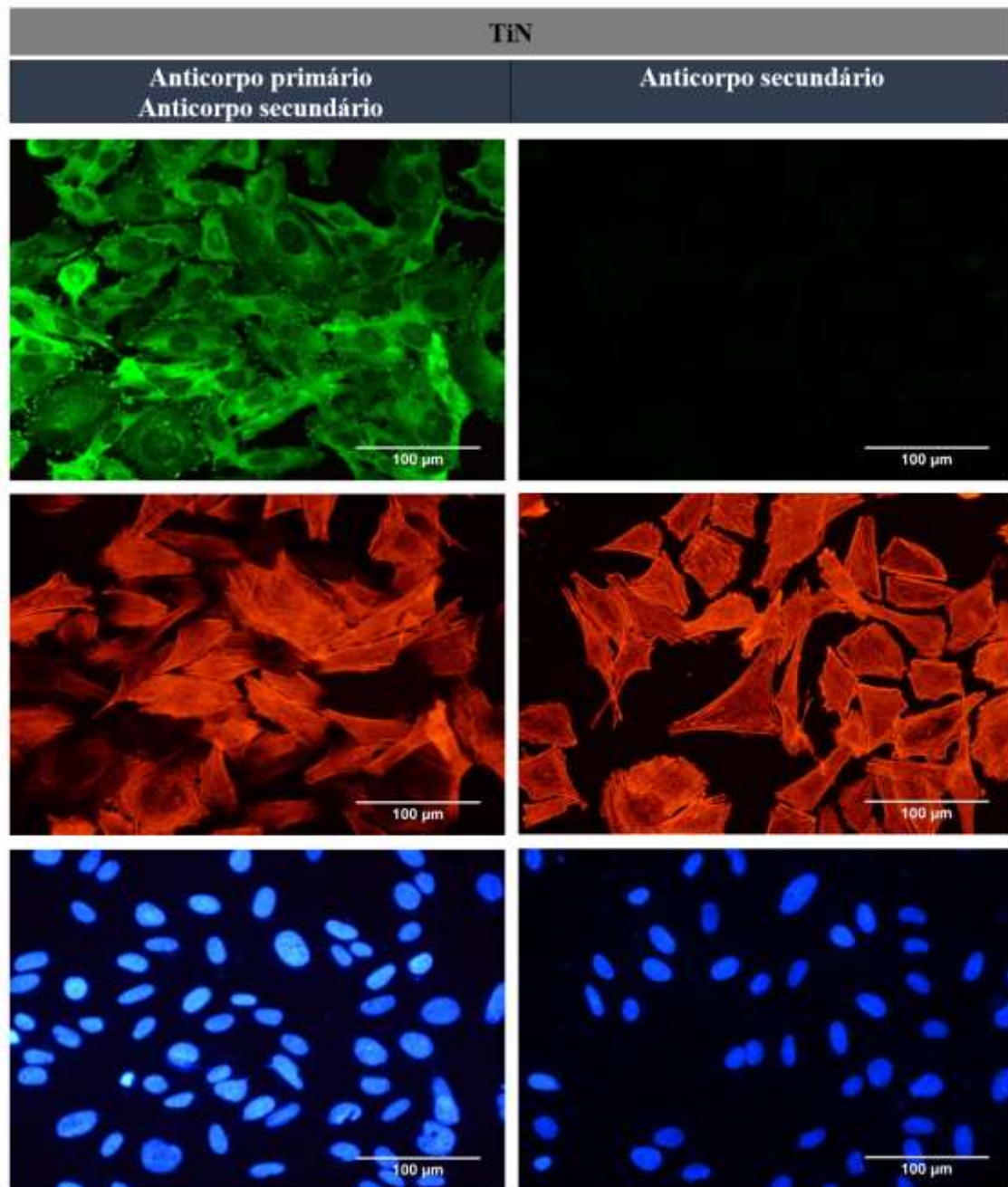


Figura 35: Resultados da marcação da imunofluorescência para o revestimento de TiN. Vinculina (verde), citoesqueleto (vermelho) e núcleos (azul).

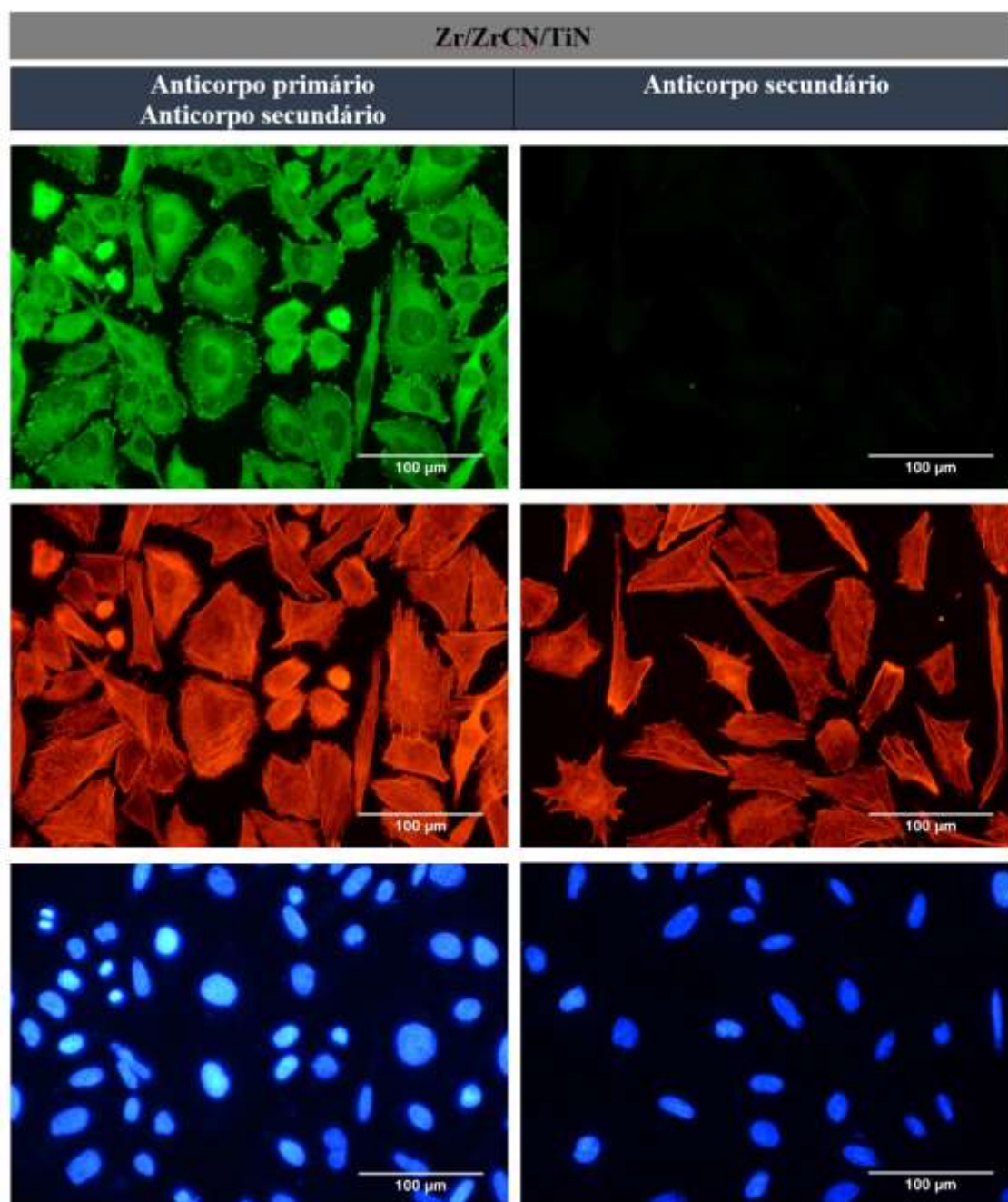


Figura 36: Resultados da marcação da imunofluorescência para o revestimento de Zr/ZrCN/TiN. Vinculina (verde), citoesqueleto (vermelho) e núcleos (azul).

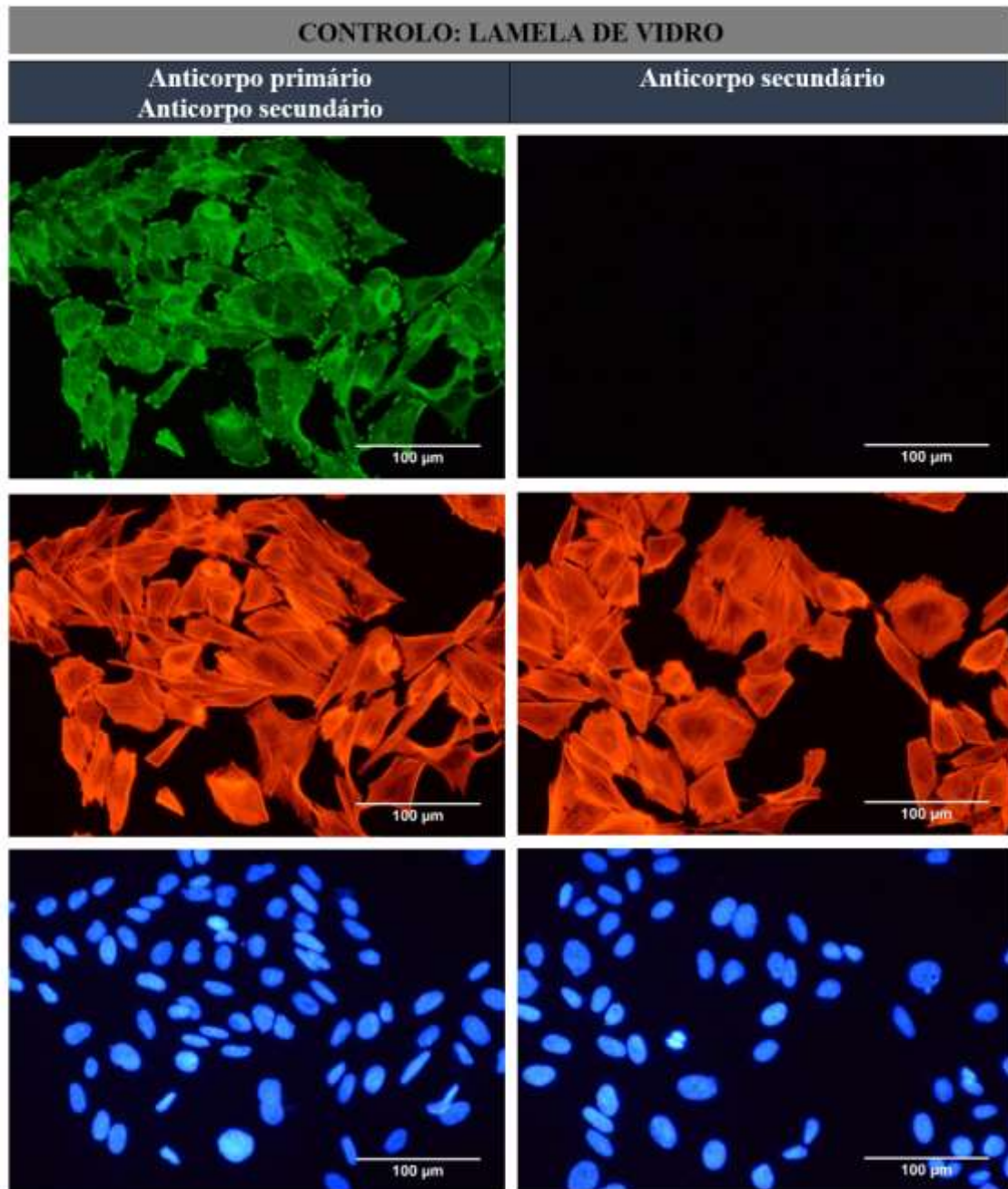


Figura 37: Resultados da marcação da imunofluorescência para a amostra de controlo (lamela de vidro). Vinculina (verde), citoesqueleto (vermelho) e núcleos (azul).

VII. DISCUSSÃO

Para dar resposta à necessidade de reabilitação de espaços edêntulos, várias opções de reabilitação e técnicas cirúrgicas têm sido avaliadas e aperfeiçoadas. Assim sendo, os esforços continuam no sentido da investigação e do desenvolvimento de materiais biocompatíveis que permitam o sucesso clínico a longo prazo. Neste sentido, este trabalho de investigação permite dar resposta a algumas questões e limitações dos materiais existentes para implantes dentários.

Além das camadas comuns, aos sistemas biológicos, foram propostos vários revestimentos inorgânicos como o TiN, com o objetivo de aumentar a resistência da superfície e reduzir os riscos de colonização bacteriana.

Os métodos usados no estudo para análise da superfície e os testes aos filmes permitiram retirar algumas conclusões pertinentes.

As análises estruturais realizadas aos filmes, aditamentos protéticos e implantes, evidenciaram a formação das estruturas cristalinas esperadas, isto é, TiN nas amostras de monocamada e, nas amostras multicamada, as fases de TiN e Zr₂CN.

A não deteção de fases cristalinas que incluam os elementos de zircónio e titânio, simultaneamente, mostra que o processo de deposição é estável (não há interferência entre camadas) e possível de reproduzir.

Através da análise por EDXS verificámos uma distribuição homogénea dos elementos atómicos pela superfície e a existência de porosidade que alcança o substrato, o que revela que no início do processo de deposição existe uma instabilidade energética que promove a projeção de macropartículas. A emancipação de macropartículas (“*droplets*”), consequente da prolongada incidência do arco sobre o cátodo e evaporação longa, promove a deposição das mesmas juntamente com o revestimento.

O número de partículas libertadas ao longo do processo pode ser reduzido para contornar esta questão. Para isso podemos reduzir a corrente do arco, aumentar a distância entre os “targets” e o substrato, aumentar a pressão do gás ou aplicar um campo magnético coaxial para aumentar a densidade.

O aumento de rugosidade está relacionado com esta questão e é consequência da emancipação destas macropartículas, o que, no caso dos implantes dentários, não seja necessariamente uma desvantagem.

Esta análise também revelou a presença de alumínio, não detetado por DRX, o que indica que este elemento se encontra inserido estruturalmente na matriz do substrato e que provém de um possível tratamento superficial para promover uma maior rugosidade e, dessa forma, maximizar a reação de osteointegração. Este achado não interferiu com os resultados e análise.

No teste mecânico de adesão, não se conseguiu arrancar substrato, logo não se verificou nenhuma fratura do tipo coesivo, apenas adesivas e falha de cola. Estes resultados prendem-se com o facto da cola não ser suficientemente forte para arrancar o substrato e estão a ser feitos esforços, no sentido de encontrar uma cola com resistência superior que permita obter uma fratura do tipo coesiva. (Ver anexo V)

No entanto, os resultados evidenciam uma melhor adesão do revestimento ao substrato em chapa de titânio, na ordem dos 2,8 MPa, comparativamente com os resultados obtidos nas chapas de aço, 2,6 MPa.

Comparando os dois revestimentos verifica-se uma tendência favorável relativamente aos valores de tensão de arrancamento no caso do TiN, apresentando valores na ordem dos 3 MPa. Considerando a necessidade de aplicar um torque de 100 N e estimando que a área superficial do corpo do implante é de, aproximadamente 140 mm², teremos uma pressão máxima aplicada de, aproximadamente 1 MPa, valor este inferior aos obtidos no teste de adesão, o que indica a inexistência de qualquer problema mecânico no uso destes filmes como revestimento médico-dentário.

Quando avaliado biologicamente, no teste de citotoxicidade, nenhum dos extratos das amostras estudadas apresentou citotoxicidade pois a viabilidade celular relativa foi superior a 90% em todas as condições analisadas. Não tendo os extratos revelado citotoxicidade assume-se que o material não possui nenhum composto lixiviável potencialmente citotóxico, sendo possível inferir a biocompatibilidade. No entanto, há necessidade de comprovação destes resultados por testes *in vivo*.

No presente estudo, também se avaliou o efeito do revestimento de TiN sobre a adesão e proliferação celular. Os resultados demonstraram que o revestimento de TiN promove a

adesão e a proliferação. As taxas de adesão, em ambas as amostras revelam elevada interação celular com o filme.

No que diz respeito à proliferação, os resultados obtidos foram idênticos ou até mesmo superiores ao do controlo de células, o que demonstra que as células não têm qualquer problema em proliferar, emigrar e ocupar toda a superfície formando uma camada confluyente tal como fazem no controlo.

Durual *et al.*, em 2011, demonstrou que o filme de TiN possibilita um aumento de 50% na proliferação celular e um elevado grau de diferenciação, quando comparado com Ti não revestido. A proliferação celular foi de aproximadamente 1,5 x superior no TiN. Se essa resposta também fosse comprovada *in vivo*, poderia se traduzir numa cicatrização acelerada em implantes revestidos com TiN nas fases iniciais do processo de osseointegração (Durual et al., 2011).

Poortinga *et al.*, em 2001, e Koerner *et al.*, em 2002, realizaram estudos que comprovaram a inércia do filme de TiN, a resistência à corrosão, a biocompatibilidade e a facilidade de deposição em diversas superfícies pelo método de PVD. Além disso, os revestimentos de TiN demonstraram diminuir a adesão bacteriana em comparação com o aço inoxidável (Koerner, Butterworth, Mayer, Dasbach, & Busscher, 2002; Poortinga, Bos, & Busscher, 2001).

No teste da fosfatase alcalina, os resultados obtidos mostram que as células presentes na superfície do substrato estão a produzir a enzima responsável pela mineralização da matriz de colagénio, em ambas as amostras e que o ambiente a que as células estão expostas, permite que continuem a expressar os genes característicos de uma célula osteoblástica, sendo propício o metabolismo dos mesmos. Vários autores obtiveram resultados concordantes com os obtidos nesta investigação (Aguirre et al., 2001; Kawata & Mikuni-Takagaki, 1998; Otsuka et al., 1998; Ralston, Todd, Helfrich, Benjamin, & Grabowski, 1994; Riancho et al., 1995).

A análise da intensidade da coloração vermelha da fosfatase alcalina evidencia uma razão de $1,51 \pm 0,05$ para as amostras de TiN e de $1,46 \pm 0,06$ para as amostras revestidas com Zr/ZrCN/TiN, o que não traduz significado estatístico.

Conclusões obtidas por Rieder *et al.*, mostram que os revestimentos de TiNOx aplicados sobre Ti rugoso ou aço inoxidável áspero aumentam a proliferação de osteoblastos *in vitro* e que o efeito sobre a proliferação celular é devido ao revestimento e independente do substrato metálico.

A taxa de proliferação aumentada, observada no TiNOx, mantendo a diferenciação normal, pode traduzir-se em dispositivos endósseos menores, mas mecanicamente e biologicamente altamente eficientes (Rieder, Scherrer, Filieri, Wiskott, & Durual, 2012).

Bachle *et al.* e Durual *et al.*, indicaram que os revestimentos de TiN em substratos rugosos estimulam a proliferação celular *in vitro* e relacionaram a ligação de osteoblastos ao substrato, tendo sido relatado que uma superfície microrugosa ($Ra < 1 - 2 \mu m$) favorece a ligação e o crescimento celular quando comparada com uma superfície polida.

O resultado à análise morfológica, pela marcação de imunofluorescência, evidenciou a adesão das células aos substratos, sendo notória e homogênea. Observou-se ainda, a existência de adesões focais explícitas na periferia das células, bem evidenciadas pela marcação do citoesqueleto e da vinculina. As extremidades dos feixes de actina, nas imagens sobrepostas, coincidem com as zonas mais intensas de marcação da vinculina que revela as zonas onde são formadas as adesões focais.

Verificou-se ainda que células cultivadas em contacto com o substrato tendem a parecer mais pequenas e arredondadas na superfície polida em comparação com células de dimensões superiores e mais achatadas observadas em superfícies microrugosas e nanorugosas. Partículas maiores que promovam o aumento da rugosidade da superfície de forma excessiva não melhoram a ligação, fixação e a viabilidade celular. Pode-se especular que há uma maior capacidade de resistência e fixação das células sobre as superfícies nano e microrugosas.

Quando utilizado na área da Medicina, em Ortopedia, vários estudos de coorte de implantes revestidos com TiN mostraram uma sobrevivência global superior a 90% com um acompanhamento de 15 a 77 meses e bons resultados clínicos (Frederick F Buechel, Helbig, D'Alessio, & Pappas, 2004; Frederick F Buechel & Pappas, 2011; Mohammed, Metcalfe, & Woodnutt, 2014).

Em Medicina Dentária, as vantagens dos revestimentos de TiN são avaliadas, em particular, devido às excelentes propriedades biológicas do titânio e ao aspeto estético da "cor dourada". No entanto, as características mecânicas e químicas, como a eliminação da corrosão eletrogalvânica e o aumento da resistência mecânica, são incentivos citados para pesquisa relacionada com a área da dentária (Mezger & Creugers, 1992).

A adesão, proliferação aumentada e a ausência de diferenciação observada no filme de TiN poderá traduzir-se, também, numa osteointegração clínica mais efetiva.

No entanto, estudos *in vivo* são necessários para confirmar esses dados. Ainda assim, o revestimento TiN abre perspectivas futuras em relação a substratos metálicos diferentes de Titânio.

VIII. CONCLUSÃO

Este trabalho de investigação permitiu estudar a superfície de implantes revestidos com Nitreto de Titânio, alcançar os objetivos propostos e inferir que:

- Os implantes com revestimento de TiN apresentam melhores características mecânicas, químicas e principalmente biológicas, quando comparados com os implantes de Titânio comercialmente puro;
- A adesão dos revestimentos em estudo não revela destacamento do substrato quando aplicada uma força inferior a 2,8 MPa;
- A porosidade inerente ao substrato é considerada controlada e reprodutível, tendo em conta as limitações e características do método de deposição do filme;
- O filme de TiN revela elevada capacidade de adesão e proliferação celular;
- Quando testado biologicamente, este revestimento, não revela citotoxicidade celular;
- As células que aderem ao revestimento adotam uma morfologia característica do seu fenótipo;
- E, por último, o revestimento de TiN, do ponto de vista biológico, mantém uma atividade metabólica indutora da mineralização.

Na escala micrométrica, os diversos tratamentos de superfície proporcionam condições favoráveis à osteointegração. No entanto, as pesquisas mais atuais direcionam a indústria para uma escala nanométrica, pois acredita-se que as modificações da superfície nesta escala afetem tanto a topografia como as propriedades químicas da superfície.

Perspetivas Futuras:

- Reprodução dos ensaios biológicos para confirmação dos resultados obtidos;
- Testes mecânicos e testes de corrosão aos revestimentos em estudo, por forma a testar a resistência e a longevidade deste composto;
- Investigação nanotecnológica e aperfeiçoamento dos compostos (introdução controlada de nanopartículas de prata, por forma a controlar a adesão bacteriana).

- Testes *in vivo* em animais e humanos para garantir a biocompatibilidade e a osteointegração, bem como a resposta do organismo;
- Certificação e validação deste filme na área da Medicina Dentária, por parte das entidades competentes;
- Culminação prática do projeto a nível industrial e aplicação clínica diária sem restrições e/ou limitações.

IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aboushelib, M. N., Osman, E., Jansen, I., Everts, V., & Feilzer, A. J. (2013). Influence of a nanoporous zirconia implant surface of on cell viability of human osteoblasts. *Journal of Prosthodontics*, 22(3), 190-195.
- Agostinho, A. C. M. G., Silveira, J. L. G. C. d., & Campos, M. L. (2015). Edentulismo, uso de prótese e autopercepção de saúde bucal entre idosos. *Rev. odontol. UNESP (Online)*, 44(2), 74-79.
- Aguirre, J., Buttery, L., O'Shaughnessy, M., Afzal, F., de Marticorena, I. F., Hukkanen, M., Polak, J. (2001). Endothelial nitric oxide synthase gene-deficient mice demonstrate marked retardation in postnatal bone formation, reduced bone volume, and defects in osteoblast maturation and activity. *The American journal of pathology*, 158(1), 247-257.
- Ajlouni, K., Elshahawy, W., Ajlouni, R., & Sadakah, A. (2017). Color masking measurement for ceramic coating of titanium used for dental implants. *The Journal of Prosthetic Dentistry*.
- Albert, D. M. t., Behrmann, R., & Barash, P. (1999). al. *Dicionário médico ilustrado Dorland*. Dicionário médico ilustrado Dorland.
- Alcoforado, G., & Redinha, L. (2008). *Reabilitação com implantes endo-ósseos*.
- Anusavice, K. J., Shen, C., & Rawls, H. R. (2013). *Phillips' science of dental materials*: Elsevier Health Sciences.
- Annunziata, M., Oliva, A., Basile, M. A., Giordano, M., Mazzola, N., Rizzo, A., Guida, L. (2011). The effects of titanium nitride-coating on the topographic and biological features of TPS implant surfaces. *Journal of dentistry*, 39(11), 720-728.
- Babbush, C. A., Hahn, J. A., Krauser, J. T., & Rosenlicht, J. L. (2010). *Dental Implants-E-Book: The Art and Science*: Elsevier Health Sciences.

- Balaceanu, M., Braic, M., Macovei, D., Genet, M., Manea, A., Pantelica, D., Negoita, F. (2002). Properties of titanium based hard coatings deposited by the cathodic arc method I. Microchemical and microstructural characteristics. *Journal of Optoelectronics and Advanced Materials*(Romania), 4(1), 107-114.
- Barbosa, T. P., PH; De Mello, JD; Costa, HL. (2015). Análise da topografia de implantes dentários com superfícies funcionais.
- Batista, M. J., Lawrence, H. P., & de Sousa, M. d. L. R. (2015). Classificação das perdas dentárias: fatores associados a uma nova medida em uma população de adultos. *Ciência & Saúde Coletiva*, 20(9), 2825-2835.
- Biotoool. Vita-Blue Cell Viability Reagent. Disponível em <http://file.biotoool.com/downloads/Vita-Blue-Cell-Viability-Reagent.pdf>. Acedido em 28/09/2017.
- Black, J. (2005). *Biological performance of materials: fundamentals of biocompatibility*: CRC Press.
- Boerboom, R. A., Krahn, K. N., Megens, R. T., van Zandvoort, M. A., Merckx, M., & Bouten, C. V. (2007). High resolution imaging of collagen organisation and synthesis using a versatile collagen specific probe. *Journal of structural biology*, 159(3), 392-399.
- Bornstein, M. M., Lussi, A., Schmid, B., Belser, U. C., & Buser, D. (2003). Early loading of nonsubmerged titanium implants with a sandblasted and acid-etched (SLA) surface: 3-year results of a prospective study in partially edentulous patients. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 18(5).
- Bosco, A. F., Bonfante, S., Luize, D. S., Bosco, J. M. D., & Garcia, V. G. (2006). Periodontal plastic surgery associated with treatment for the removal of gingival overgrowth. *Journal of Periodontology*, 77(5), 922-928.
- Boucher, C. O., & Zwemer, T. J. (1993). *Boucher's clinical dental terminology: a glossary of accepted terms in all disciplines of dentistry*: CV Mosby.

- Brandão, M. L. d., Esposti, T. B. D., Bisognin, E. D., Harari, N. D., Vidigal Jr, G. M., & Conz, M. B. (2010). Superfície dos implantes osseointegrados X resposta biológica. *ImplantNews*, 95-101.
- Buechel, F. F., & Pappas, M. J. (1999). Prosthesis with biologically inert wear resistant surface. In: Google Patents.
- Buechel, F. F., & Pappas, M. J. (2011). A metal/ultrahigh-molecular-weight polyethylene cementless surface replacement. Paper presented at the Seminars in Arthroplasty.
- Buechel, F. F., Helbig, T. E., D'Alessio, J., & Pappas, M. J. (2004). Two-to 12-year evaluation of cementless Buechel-Pappas total hip arthroplasty. *The Journal of arthroplasty*, 19(8), 1017-1027.
- Burkhardt, R., Joss, A., & Lang, N. P. (2008). Soft tissue dehiscence coverage around endosseous implants: a prospective cohort study. *Clinical oral implants research*, 19(5), 451-457.
- BwOptics. Introduction to Fluorescence Microscopy. Disponível em <http://www.bwoptics.com/newsend2.asp?id=5>. Acedido em 08/09/2017.
- Centro de Microscopia Electrónica. Microscópio Eletrónico de Varrimento. Disponível em <http://micelectro.fc.ul.pt/page2/page2.html>, acedido em 20/04/2015. Acedido em 28/10/2017.
- Charyeva, O., Altynbekov, K., Zhartybaev, R., & Sabdanaliev, A. (2012). Long-term dental implant success and survival--a clinical study after an observation period up to 6 years. *Swedish dental journal*, 36(1), 1-6.
- Costa, L. J. d., Sousa, E. T. d., Lucena, F. L. d., & Souza, R. C. V. d. (2015). Superfície de implantes de titânio e sua capacidade de estímulo na formação óssea: uma revisão de literatura. *Odontologia Clínico-Científica (Online)*, 14(4), 797-800.
- Craddock, H. L. (2009). Consequences of tooth loss: 1. The patient perspective—Aesthetic and functional implications. *Dental update*, 36(10), 616-619.
- Craig, R. G., & Powers, J. M. (2004). *Materiais dentários restauradores*: Santos.

- Daguano, J., Santos, C., & Rogero, S. (2007). Avaliação da citotoxicidade de biocerâmicas desenvolvidas para uso em sistemas de implantes. *Matéria* (Rio de Janeiro), 12(1), 134-139.
- Davies, J. (1998). Mechanisms of endosseous integration. *International Journal of Prosthodontics*, 11(5).
- Davis, J. R., & Metals, A. S. f. (1998). ASM handbook. 2. Properties and selection: nonferrous alloys and special-purpose materials: ASM international.
- De Carvalho, B., Pellizzer, E., De Moraes, S., Falcón-Antenucci, R., & Ferreira Júnior, J. (2009). Tratamentos de superfície nos implantes dentários. *Rev. Cir. Traumatol. Buco-Maxilofac.*, Camaragibe, 9(1), 123-130.
- DeFelsko Catalog. Summer Coating Thickness Gages and Inspection Instruments. Disponível em <http://docplayer.net/53417764-Defelsko-catalog-summer-coating-thickness-gages-and-inspection-instruments.html>. Acedido em 23/09/2017.
- Delgado-Ruiz, R. A., Abboud, M., Romanos, G., Aguilar-Salvatierra, A., Gomez-Moreno, G., & Calvo-Guirado, J. L. (2015). Peri-implant bone organization surrounding zirconia-microgrooved surfaces circularly polarized light and confocal laser scanning microscopy study. *Clinical oral implants research*, 26(11), 1328-1337.
- Delgado-Ruiz, R., Calvo-Guirado, J., Moreno, P., Guardia, J., Gomez-Moreno, G., Mate-Sánchez, J., Chiva, F. (2011). Femtosecond laser microstructuring of zirconia dental implants. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 96(1), 91-100.
- Dion, I., Baquey, C., Candelon, B., & Monties, J. (1992). Hemocompatibility of titanium nitride. *The International journal of artificial organs*, 15(10), 617-621.
- Direct Industry. Leitor de microplacas Biotek. Disponível em <http://www.directindustry.com/pt/prod/biotek-instruments/product-34307-615728.html>. Acedido em 25/09/2017.

- Diz, P., Scully, C., & Sanz, M. (2013). Dental implants in the medically compromised patient. *Journal of dentistry*, 41(3), 195-206.
- Durual, S., Pernet, F., Rieder, P., Mekki, M., Cattani-Lorente, M., & Wiskott, H. (2011). Titanium nitride oxide coating on rough titanium stimulates the proliferation of human primary osteoblasts. *Clinical oral implants research*, 22(5), 552-559.
- Ellingsen, J. E., Thomsen, P., & Lyngstadaas, S. P. (2006). Advances in dental implant materials and tissue regeneration. *Periodontology 2000*, 41(1), 136-156.
- Emami, E., de Souza, R. F., Kabawat, M., & Feine, J. S. (2013). The impact of edentulism on oral and general health. *International journal of dentistry*, 2013.
- Gaintantzopoulou, M., Zinelis, S., Silikas, N., & Eliades, G. (2014). Micro-Raman spectroscopic analysis of TiO₂ phases on the root surfaces of commercial dental implants. *Dental Materials*, 30(8), 861-867.
- Guez, G. (2002). Immediate implantation with provisionalization: From literature to clinical implications. *Pract Proced Aesthet Dent*, 14(9), 699-707.
- Heydecke, G., Kohal, R., & Gläser, R. (1999). Optimal esthetics in single-tooth replacement with the Re-Implant system: a case report. *International Journal of Prosthodontics*, 12(2).
- Iezzi, G., Scarano, A., Di Stefano, D., Arosio, P., Ricci, L., Piattelli, A., & Perrotti, V. (2015). Correlation between the bone density recorded by a computerized implant motor and by a histomorphometric analysis: a preliminary in vitro study on bovine ribs. *Clinical implant dentistry and related research*, 17(S1).
- Ikarashi, Y., Toyoda, K., Kobayashi, E., Doi, H., Yoneyama, T., Hamanaka, H., & Tsuchiya, T. (2005). Improved biocompatibility of titanium–zirconium (Ti–Zr) alloy: tissue reaction and sensitization to Ti–Zr alloy compared with pure Ti and Zr in rat implantation study. *Materials transactions*, 46(10), 2260-2267.
- Ivitrogen. Espectros de absorvância da resazurina e da resorufina. Disponível em <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/PrestoBlueFAQ.pdf>. Acedido em 22/09/2017.

- Jung, R. E., Pjetursson, B. E., Glauser, R., Zembic, A., Zwahlen, M., & Lang, N. P. (2008). A systematic review of the 5-year survival and complication rates of implant-supported single crowns. *Clinical oral implants research*, 19(2), 119-130.
- Kawata, A., & Mikuni-Takagaki, Y. (1998). Mechanotransduction in stretched osteocytes—temporal expression of immediate early and other genes. *Biochemical and biophysical research communications*, 246(2), 404-408.
- Kearns, V. R., Williams, R. L., Mirvakily, F., Doherty, P. J., & Martin, N. (2013). Guided gingival fibroblast attachment to titanium surfaces: an in vitro study. *Journal of clinical periodontology*, 40(1), 99-108.
- Koerner, R., Butterworth, L., Mayer, I., Dasbach, R., & Busscher, H. (2002). Bacterial adhesion to titanium-oxy-nitride (TiNOX) coatings with different resistivities: a novel approach for the development of biomaterials. *Biomaterials*, 23(14), 2835-2840.
- Kohal, R. J., Att, W., Bächle, M., & Butz, F. (2008). Ceramic abutments and ceramic oral implants. An update. *Periodontology 2000*, 47(1), 224-243.
- Kohal, R. J., Klaus, G., & Strub, J. R. (2006). Zirconia-implant-supported all-ceramic crowns withstand long-term load: a pilot investigation. *Clinical oral implants research*, 17(5), 565-571.
- Kohal, R. J., Weng, D., Bächle, M., & Strub, J. R. (2004). Loaded custom-made zirconia and titanium implants show similar osseointegration: an animal experiment. *Journal of Periodontology*, 75(9), 1262-1268.
- Lange, R., Lüthen, F., Beck, U., Rychly, J., Baumann, A., & Nebe, B. (2002). Cell-extracellular matrix interaction and physico-chemical characteristics of titanium surfaces depend on the roughness of the material. *Biomolecular engineering*, 19(2), 255-261.
- Le Guéhennec, L., Soueidan, A., Layrolle, P., & Amouriq, Y. (2007). Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. *Dental Materials*, 23(7), 844-854.

- Liu, R., Lei, T., Dusevich, V., Yao, X., Liu, Y., Walker, M. P., Ye, L. (2013). Surface characteristics and cell adhesion: a comparative study of four commercial dental implants. *Journal of Prosthodontics*, 22(8), 641-651.
- Lou, W., Dong, Y., Zhang, H., Jin, Y., Hu, X., Ma, J., Wu, G. (2015). Preparation and characterization of lanthanum-incorporated hydroxyapatite coatings on titanium substrates. *International journal of molecular sciences*, 16(9), 21070-21086.
- Maurer, A. M., Brown, S. A., Payer, J. H., Merritt, K., & Kawalec, J. S. (1993). Reduction of fretting corrosion of Ti-6Al-4V by various surface treatments. *Journal of orthopaedic research*, 11(6), 865-873.
- Mendonça, G., Mendonça, D. B., Aragao, F. J., & Cooper, L. F. (2008). Advancing dental implant surface technology—from micron-to nanotopography. *Biomaterials*, 29(28), 3822-3835.
- Mezger, P., & Creugers, N. (1992). Titanium nitride coatings in clinical dentistry. *Journal of dentistry*, 20(6), 342-344.
- Misch, C. (2011). *Implantes dentais contemporâneos*: Elsevier Brasil.
- Mohammed, A., Metcalfe, A., & Woodnutt, D. (2014). Medium-term outcome of titanium nitride, mobile bearing total knee replacement. *Acta Orthop Belg*, 80(2), 269-275.
- Montandon, A. A. B., Zuza, E. P., & de Toledo, B. E. C. (2012). Prevalence and reasons for tooth loss in a sample from a dental clinic in Brazil. *International journal of dentistry*, 2012.
- Otsuka, E., Hirano, K., Matsushita, S., Inoue, A., Hirose, S., Yamaguchi, A., & Hagiwara, H. (1998). Effects of nitric oxide from exogenous nitric oxide donors on osteoblastic metabolism. *European journal of pharmacology*, 349(2), 345-350.
- Ordem dos Médicos Dentistas. Barômetro Nacional de Saúde Oral 2015. Disponível em <https://www.omd.pt/barometro/docs/barometrosaudeoral2015.pdf>. Acedido em 16/08/2017.

- Piscanec, S., Ciacchi, L. C., Vesselli, E., Comelli, G., Sbaizero, O., Meriani, S., & De Vita, A. (2004). Bioactivity of TiN-coated titanium implants. *Acta Materialia*, 52(5), 1237-1245.
- Poortinga, A. T., Bos, R., & Busscher, H. J. (2001). Charge transfer during staphylococcal adhesion to TiNOX® coatings with different specific resistivity. *Biophysical chemistry*, 91(3), 273-279.
- Prachar, P., Bartakova, S., Brezina, V., Cvrcek, L., & Vanek, J. (2015). Cytocompatibility of implants coated with titanium nitride and zirconium nitride. *Bratislavske lekarske listy*, 116(3), 154-156.
- Ralston, S. H., Todd, D., Helfrich, M., Benjamin, N., & Grabowski, P. S. (1994). Human osteoblast-like cells produce nitric oxide and express inducible nitric oxide synthase. *Endocrinology*, 135(1), 330-336.
- Riancho, J. A., Salas, E., Zarrabeitia, M. T., Olmos, J. M., Amado, J. A., Fernández-Luna, J. L., & González-Macías, J. (1995). Expression and functional role of nitric oxide synthase in osteoblast-like cells. *Journal of Bone and Mineral Research*, 10(3), 439-446.
- Rieder, P., Scherrer, S., Filieri, A., Wiskott, H., & Durual, S. (2012). TiNOx coatings increase human primary osteoblasts proliferation independently of the substrate—A short report. *Bio-Medical Materials and Engineering*, 22(5), 277-281.
- Ring, M. E., & do Nascimento, F. G. (1995). *Historia ilustrada de la odontología*: Mosby-Doyma Libros.
- Rodriguez y Baena, R., Rizzo, S., Manzo, L., & Lupi, S. M. (2017). Nanofeatured Titanium Surfaces for Dental Implantology: Biological Effects, Biocompatibility, and Safety. *Journal of Nanomaterials*, 2017.
- Rogero, S. O., Lugão, A. B., Ikeda, T. I., & Cruz, Á. S. (2003). Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. *Materials Research*, 6(3), 317-320.

- Sadan, A., Blatz, M. B., Salinas, T. J., & Block, M. S. (2004). Single-implant restorations: a contemporary approach for achieving a predictable outcome. *Journal of oral and maxillofacial surgery*, 62, 73-81.
- Sakaguchi, R. L., & Powers, J. M. (2012). *Craig's Restorative Dental Materials-E-Book*: Elsevier Health Sciences.
- Shillingburg, H. T. (2012). *Fundamentals of fixed prosthodontics*.
- Singular Implants. Tipos de osso. Disponível em <http://www.singularimplants.com.br/cone-morse-cilindrico>. Acedido em 20/09/2017.
- Sridhar, S., Wilson, T. G., Palmer, K. L., Valderrama, P., Mathew, M. T., Prasad, S., Rodrigues, D. C. (2015). In vitro investigation of the effect of oral bacteria in the surface oxidation of dental implants. *Clinical implant dentistry and related research*, 17(S2).
- Svanborg, L. M., Andersson, M., & Wennerberg, A. (2010). Surface characterization of commercial oral implants on the nanometer level. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 92(2), 462-469.
- Thalji, G., & Cooper, L. F. (2014). Molecular assessment of osseointegration in vitro: a review of current literature. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 29(2).
- Tomé, S. B., Tonetto, A., Heizemann, G., Burmann, P. F. P., dos Santos Beck, D. G., Bruggemann, R., & Ruschel, G. H. (2015). Estado atual das superfícies de implantes dentários de titânio. *Revista saúde integrada*, 6(11-12), 39-58.
- Toth, L. (2014). *Transition metal carbides and nitrides*: Elsevier.
- Trisi, P., Lazzara, R., Rebaudi, A., Rao, W., Testori, T., & Porter, S. S. (2003). Bone-implant contact on machined and dual acid-etched surfaces after 2 months of healing in the human maxilla. *Journal of Periodontology*, 74(7), 945-956.
- van Hove, R. P., Sierevelt, I. N., van Royen, B. J., & Nolte, P. A. (2015). Titanium-nitride coating of orthopaedic implants: a review of the literature. *BioMed research international*, 2015.

Wang, X., Bank, R. A., TeKoppele, J. M., & Agrawal, C. (2001). The role of collagen in determining bone mechanical properties. *Journal of orthopaedic research*, 19(6), 1021-1026.

Williams, J. H. (2017). *Crystal Engineering: How Molecules Build Solids*. Morgan & Claypool Publishers.

Wikipedia Republished. Câmara de Neubauer. Disponível em https://wiki2.org/es/Archivo:Reticulo_Neubauer_jpg. Acedida em 17/08/2017.

X. ANEXOS

ANEXO I



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Departamento de Ciência dos Materiais
Centro de Investigação de Materiais

DECLARAÇÃO

João Paulo Miranda Ribeiro Borges, Professor Auxiliar do Departamento de Ciência dos Materiais da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa e investigador do CENIMAT/i3N, vem por este meio declarar que se compromete a colaborar no trabalho de dissertação de Mestrado da aluna Patrícia Domingues Prior Neves, no Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz, com o tema "Caracterização de revestimentos de Nitreto de Titânio para implantes dentários e aditamentos odontológicos" com a função de co-orientação. Este projeto de mestrado engloba ainda a colaboração das instituições Universidade de Aveiro e Prirev – revestimentos técnicos, Lda.

Caparica, 8 de Março de 2017.

João Paulo Miranda Ribeiro Borges

ANEXO II



PRIREV
ENGENHARIA DE SUPERFÍCIES

DECLARAÇÃO

Para quem possa interessar, declara-se que a Prirev – Equipamentos e Revestimentos Técnicos, Lda compromete-se com a colaboração necessária no Projeto de Mestrado de Patrícia Domingues Prior Neves do Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz com o título “Caracterização de revestimentos de Nitreto de Titânio para implantes dentários e aditamentos protéticos.

Em colaboração com a Universidade de Aveiro, Fundação para a Ciência e Tecnologia e Prirev – Equipamentos e Revestimentos Técnicos, Lda, de acordo com os objetivos e hipóteses de investigação propostas.

Vagos, 7 de Março de 2017

Eng. Luis Godinho
Diretor Técnico da Prirev – Equip. e Revestimentos Técnicos, Lda

ANEXO III

departamento de física

universidade de aveiro



theoria poesis praxis

DECLARAÇÃO

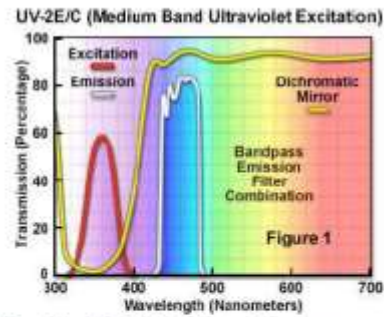
Manuel Pedro Fernandes Graça, Investigador Principal do I3N e do Departamento de Física da Universidade de Aveiro vem por este meio declarar que se compromete a colaborar no trabalho de dissertação de Mestrado da aluna Patricia Domingues Prior Neves, no Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz com o tema "Caracterização de revestimentos de Nitreto de Titânio para implantes dentários e aditamentos odontológicos com a função de co-orientação. Este projeto de mestrado engloba ainda a colaboração das instituições FCT-UNL e Prirev – revestimentos técnicos, Lda.

Aveiro, 6 de Março de 2017

Manuel Pedro Fernandes Graça

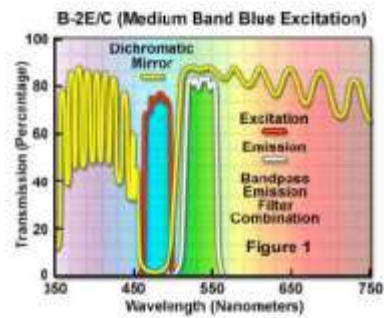
ANEXO IV

Nikon Ti-S



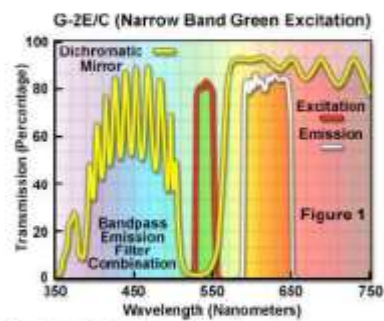
Ultraviolet Excitation Filter Block UV-2E/C Specifications:

- Excitation Filter Wavelengths: 340-380 nanometers (bandpass, 360 CWL)
- Dichromatic Mirror Cut-on Wavelength: 400 nanometers (longpass, LP)
- Barrier Filter Wavelengths: 435-485 nanometers (bandpass, 460 CWL)



Blue Excitation Filter Block B-2E/C Specifications:

- Excitation Filter Wavelengths: 465-495 nanometers (bandpass, 480 CWL)
- Dichromatic Mirror Cut-on Wavelength: 505 nanometers (longpass, LP)
- Barrier Filter Wavelengths: 515-555 nanometers (bandpass, 535 CWL)



Green Excitation Filter Block G-2E/C Specifications:

- Excitation Filter Wavelengths: 528-553 nanometers (bandpass, 540 CWL)
- Dichromatic Mirror Cut-on Wavelength: 565 nanometers (longpass, LP)
- Barrier Filter Wavelengths: 590-650 nanometers (bandpass, 620 CWL)

ANEXO V

▼ Product Details	
Typical Use:	Ideal for bonding metals and plastics. Non-sag paste for large gap fill or vertical surfaces.
Chemical Composition:	Epoxy
Color:	Gray
Components:	2 part
Cure System:	Room Temperature/Heat
Cure Time:	24 to 48h @ room temperature; 2h @ 65 °C; 20min @ 100 °C
Dielectric Strength:	410 V/mil
Elongation:	2.8%
Flash Point:	Part A: >93 °C; Part B: >118 °C
Hardness:	80 D
Mix Ratio:	1:1 by volume; 1:1 by weight
Service Temperature:	-40 to 150 °C
Shear Strength:	2,300
Specific Gravity:	Part A: 1.26; Part B: 1.25; Mixed: 1.25
Tensile Strength:	5,500 psi
Thermal Conductivity:	0.27 W/mK
Viscosity:	Part A: 329,000; Part B: 235,000; Mixed: 440,000
Volume Resistivity:	6.18 x 10 ¹⁵ ohm-cm @ 20 °C

ANEXO VI

01-078-6300 Oct 6, 2017 8:56 AM (artursarabando)

Status Alternate QM: Star Pressure/Temperature: Ambient Chemical Formula: Si
 Empirical Formula: Si Weight %: Si100.00 Atomic %: Si100.00 Compound Name: Silicon
 Entry Date: 09/01/2011 Last Modification Date: 09/01/2013 Last Modifications: DBStatus

Radiation: CuK α 1 λ : 1.5406 Å d-Spacing: Calculated Intensity: Calculated - Peak λ : 4.15
 λ /c - CW ND: 0.51

SYS: Cubic SPGR: Ia-3 (206)
 Author's Cell [AuthCell a: 6.6265(1) Å AuthCell Vol: 290.97 Å³ AuthCell Z: 16.00 AuthCell MolVol: 18.19
 Density [Dcalc: 2.564 g/cm³ Dstruc: 2.56 g/cm³ SS/FOM: F(29) = 999.9(0.0003, 29)
 Temp: 298.0 K (Ambient temperature assigned by ICDD editor) R-factor: 0.058

Space Group: Ia-3 (206) Molecular Weight: 28.09 g/mol
 Crystal Data [XtiCell a: 6.627 Å XtiCell b: 6.627 Å XtiCell c: 6.627 Å XtiCell α : 90.00°
 XtiCell β : 90.00° XtiCell γ : 90.00° XtiCell Vol: 290.97 Å³ XtiCell Z: 16.00]
 Crystal Data Axial Ratio [a/b: 1.000 c/b: 1.000]
 Reduced Cell [RedCell a: 5.739 Å RedCell b: 5.739 Å RedCell c: 5.739 Å RedCell α : 109.47°
 RedCell β : 109.47° RedCell γ : 109.47° RedCell Vol: 145.49 Å³]

Atomic parameters are cross-referenced from PDF entry 04-007-2062 ADP: B

Crystal (Symmetry Allowed): Centrosymmetric

SG Symmetry Operators:

Seq	Operator	Seq	Operator	Seq	Operator	Seq	Operator	Seq	Operator	Seq	Operator
1	x,y,z	5	-x+1/2,y,-z	9	z,x,y	13	-z+1/2,x,-y	17	y,z,x	21	-y+1/2,z,-x
2	-x,-y,-z	6	x+1/2,-y,z	10	-z,-x,-y	14	z+1/2,-x,y	18	-y,-z,-x	22	y+1/2,z,x
3	x,-y,z+1/2	7	-x,-y+1/2,z	11	z,-x,y+1/2	15	-z,-x+1/2,y	19	y,-z,-y+1/2	23	-y,-z+1/2,x
4	-x,y,z+1/2	8	x,y+1/2,-z	12	z,x,y+1/2	16	z,x+1/2,-y	20	-y,z,x+1/2	24	y,z+1/2,-x

Atomic Coordinates:

Atom	Num	Wyckoff	Symmetry	x	y	z	SOF	Riso	AET
Si	1	16c	3.	0.1003	0.1003	0.1003	1.0	0.89	4-8

Subfile(s): Inorganic, Metals & Alloys Pearson Symbol: cI16_00 Prototype Structure [Formula Order]: Si
 Prototype Structure [Alpha Order]: Si ANX: N

Cross-Ref PDF #s: 00-017-0901 (Primary), 01-072-1426 (Alternate), 01-079-0613 (Alternate), ✓ 04-002-2835 (Alternate),
 ✓ 04-007-2062 (Primary), ✓ 04-013-5947 (Alternate)

References:

Type	DOI	Reference
Primary Reference		Calculated from ICSD using POWD-12++.
Crystal Structure		Crystal Structure Source: LFP
Structure	10.1002/zaac.200900051	*Crystal structure refinement and electronic properties of Si(c16)*. Woitkus, A., Rosner, H., Schmalz, W., Schwarz, U. Z. Anorg. Allg. Chem. 635, 700 (2009)

Database Comments: ANX: N. Analysis: Si1. Formula from original source: Si. ICSD Collection Code: 246372. Calculated Pattern Original Remarks: R = R(p). Synthesis conditions: Si(c8) at 12(1.5) GPa and temperatures between 800(100) and 1299(120) K. a = 6.6229 Å (X-ray laboratory source). Wyckoff Sequence: c (IA3-). Unit Cell Data Source: Powder Diffraction.

d-Spacings (2 θ) - Si - 01-078-6300 (Stick, Fixed Slt Intensity) - Cu K α 1 1.54056 Å

2 θ (°)	d (Å)	I	h	k	l	°	2 θ (°)	d (Å)	I	h	k	l	°	2 θ (°)	d (Å)	I	h	k	l	°
26.8968	3.313250	189	2	0	0		72.7011	1.209560	68	1	3	4		107.2883	0.956453	13	4	4	4	
33.0859	2.795260	999	2	1	1		79.0901	1.209830	87	1	2	5		110.5624	0.937129	31	3	4	5	
38.3699	2.342820	11	2	2	0		82.2291	1.171410	58	4	4	0		113.9086	0.918930	44	0	4	0	
47.4910	1.912910	1	2	2	2		85.3441	1.156440	6	4	3	3		117.3438	0.901752	65	7	2	1	
51.5827	1.771019	642	3	2	1		88.4459	1.104420	36	6	0	0		120.8890	0.885503	7	2	4	6	
55.4163	1.656930	155	4	0	0		91.5434	1.074960	153	5	3	2		132.4949	0.841566	27	6	5	1	
59.0989	1.561880	52	4	1	1		94.8453	1.047740	8	6	2	0		136.8504	0.828313	3	8	0	0	
62.6446	1.481730	34	4	2	0		97.7605	1.022490	16	1	4	5		141.5933	0.815666	36	8	1	1	
66.0903	1.412770	45	3	3	2		100.8992	0.998982	1	6	2	2		146.8951	0.803581	26	6	4	4	
69.4263	1.352630	2	4	2	2		104.0714	0.977024	30	1	3	6								

ANEXO VII

04-018-6622

Oct 6, 2017 8:59 AM (artursarabando)

Status Alternate OM: Indexed Pressure/Temperature: Pressure (Non-ambient) Chemical Formula: Ti
 Empirical Formula: Ti Weight %: Ti100.00 Atomic %: Ti100.00 Compound Name: Titanium
 Entry Date: 09/01/2014

Radiation: CuKα1 λ: 1.5406 Å d-Spacing: Calculated Intensity: Calculated - Peak I/c: 6.42
 I/c - CW ND: 0.23

SYS: Hexagonal SPGR: P63/mmc (194)
 Author's Cell [AuthCell a: 2.91 Å AuthCell c: 4.59 Å AuthCell Vol: 33.66 Å³ AuthCell Z: 2.00]
 AuthCell MolVol: 16.83 Author's Cell Axial Ratio [c/a: 1.577]
 Density [Dcalc: 4.726 g/cm³ Dstruc: 4.72 g/cm³] SS/FOM: F(22) = 999.9(0.0004, 22)
 Temp: 298.0 K (Author provided temperature)

Space Group: P63/mmc (194) Molecular Weight: 47.90 g/mol
 Crystal Data [XtiCell a: 2.910 Å XtiCell b: 2.910 Å XtiCell c: 4.590 Å XtiCell α: 90.00°
 XtiCell β: 90.00° XtiCell γ: 120.00° XtiCell Vol: 33.66 Å³ XtiCell Z: 2.00]
 Crystal Data Axial Ratio [c/a: 1.577 a/b: 1.000 c/b: 1.577]
 Reduced Cell [RedCell a: 2.910 Å RedCell b: 2.910 Å RedCell c: 4.590 Å RedCell α: 90.00°
 RedCell β: 90.00° RedCell γ: 120.00° RedCell Vol: 33.66 Å³]

Crystal (Symmetry Allowed): Centrosymmetric

SG Symmetry Operators:

Seq	Operator	Seq	Operator	Seq	Operator	Seq	Operator	Seq	Operator	Seq	Operator
1	x,y,z	5	-x+y,-x,z	9	x,x,y,z	13	-x,-y,z+1/2	17	x,y,x,z+1/2	21	-x,-x+y,z+1/2
2	-x,-y,-z	6	x,y,x,-z	10	-x,-x+y,-z	14	x,y,-z+1/2	18	-x,-y,-z+1/2	22	x,y,-z+1/2
3	-y,x,y,z	7	-y,x,z	11	-x+y,y,z	15	y,-x,y,z+1/2	19	y,x,z+1/2	23	x,y,-z+1/2
4	y,-x,y,-z	8	y,x,-z	12	x-y,y,-z	16	-y,x-y,-z+1/2	20	-y,-x,-z+1/2	24	-x+y,y,-z+1/2

Atomic Coordinates:

Atom	Num	Wyckoff	Symmetry	x	y	z	SOF	IDP	AET
Ti	1	2c	-6m2	0.33333	0.00000	0.25	1.0		

Subfile(s): Inorganic, Metals & Alloys Pearson Symbol: hP2.00

LPF Prototype Structure [Formula Order]: Mg,hP2.194 LPF Prototype Structure [Alpha Order]: Mg,hP2.194

Cross-Ref PDF #s: 00-001-1197 (Deleted), 00-001-1198 (Deleted), 00-005-0682 (Alternate), 00-044-1294 (Primary),
 01-071-4632 (Alternate), 01-072-4624 (Alternate), 01-079-6693 (Alternate), 01-083-4054 (Alternate),
 01-083-5019 (Alternate), 01-084-3903 (Alternate), 01-084-3905 (Alternate), 01-089-2762 (Alternate),
 01-089-2959 (Alternate), 01-089-3073 (Alternate), 01-089-3725 (Alternate), 01-089-4893 (Alternate),
 01-089-5009 (Alternate), 03-065-3362 (Alternate), 03-065-6231 (Alternate), 04-001-8963
 (Primary), 04-002-2539 (Alternate), 04-002-5207 (Alternate), 04-002-5384 (Alternate),
 04-003-2226 (Alternate), 04-003-5042 (Alternate), 04-003-5531 (Alternate), 04-003-5533
 (Alternate), 04-003-5550 (Alternate), 04-003-5575 (Alternate), 04-003-5577 (Alternate),
 04-003-7293 (Alternate), 04-004-3071 (Alternate), 04-004-4447 (Alternate), 04-004-7631
 (Alternate), 04-004-8449 (Alternate), 04-004-8480 (Alternate), 04-004-8487 (Alternate),
 04-004-9042 (Alternate), 04-004-9158 (Alternate), 04-005-7594 (Alternate), 04-005-7641
 (Alternate), 04-006-2824 (Alternate), 04-006-6380 (Alternate), 04-007-9313 (Alternate),
 04-007-9759 (Alternate), 04-008-1385 (Alternate), 04-008-4973 (Alternate), 04-011-9045
 (Alternate), 04-015-0276 (Alternate), 04-015-8644 (Alternate)

References:

Type	DOI	Reference
------	-----	-----------

Primary Reference Calculated from LPF using POWD-12++.

Structure	"Crystallographic structure of Ti-6Al-4V, Ti-HP and Ti-CP under High-Pressure". Halevy I., Zamir G., Wintemose M., Sanji G., Grandini C.R., Moreno Gobi A. J. Phys.: Conf. Ser. 215: 1-9 (2010).
-----------	--

Database Comments: LPF Collection Code: 1931747. Pressure of Datacollection: 6.9 GPa. Temperature of Data Collection: 298 K. Minor Warning: No R factors reported/abstracted. No e.s.d reported/abstracted on the cell dimension. Unit Cell Data Source: Powder Diffraction.

d-Spacings (22) - Ti - 04-018-6622 (Stick, Fixed Slit Intensity) - Cu Kα1 1.54056 Å

2θ (°)	d (Å)	I	h	k	l	°	2θ (°)	d (Å)	I	h	k	l	°	2θ (°)	d (Å)	I	h	k	l	°
35.5947	2.520130	260	1	0	0		78.6795	1.215110	80	2	0	1		122.2226	0.879757	16	2	1	2	
39.2222	2.295000	258	0	0	2		84.3300	1.147500	14	0	0	4		126.5105	0.862556	24	1	0	5	
40.8144	2.090070	989	1	0	1		88.4348	1.104530	17	2	0	2		130.4345	0.848416	8	2	0	4	
53.0951	1.696830	120	1	0	2		95.0507	1.044340	14	1	0	4		132.8688	0.843045	15	3	0	0	
63.9301	1.455900	122	1	1	0		104.1223	0.972663	32	2	0	3		137.5548	0.820320	1	3	0	1	
72.1681	1.307840	112	1	0	3		107.9334	0.952521	10	2	1	0		144.5711	0.808821	44	2	1	3	
75.3670	1.260070	16	2	0	0		111.3605	0.932951	58	2	1	1								
77.6333	1.228850	111	1	1	2		117.4990	0.901010	35	1	1	4								

ANEXO VIII

04-001-6512

Oct 6, 2017 8:58 AM (artursarabando)

Status: Primary QM: Indexed Pressure/Temperature: Ambient Chemical Formula: Zr C0.5 N0.5
 Empirical Formula: C0.5 N0.5 Zr Weight %: C5.76 N6.72 Zr87.52 Atomic %: C25.00 N25.00 Zr50.00
 Compound Name: Zirconium Carbide Nitride Entry Date: 09/01/2005 Last Modification Date: 09/01/2011
 Last Modifications: Reflections

Radiation: CuK α 1 λ : 1.5406 Å d-Spacing: Calculated Intensity: Calculated - Peak χ : 8.81
 χ /c - CW ND: 1.02

SYS: Cubic SPGR: Fm-3m (225)
 Author's Cell [AuthCell a: 4.635 Å AuthCell Vol: 99.57 Å³ AuthCell Z: 4.00 AuthCell MolVol: 24.89]
 Density [Dealc: 6.953 g/cm³ Dstruc: 6.95 g/cm³] SS/FOM: F(11) = 999.9(0.0002, 11)
 Temp: 298.0 K (Ambient temperature assigned by ICDD editor)

Space Group: Fm-3m (225) Molecular Weight: 104.23 g/mol
 Crystal Data [XtiCell a: 4.635 Å XtiCell b: 4.635 Å XtiCell c: 4.635 Å XtiCell α : 90.00°
 XtiCell β : 90.00° XtiCell γ : 90.00° XtiCell Vol: 99.57 Å³ XtiCell Z: 4.00]
 Crystal Data Axial Ratio [a/b: 1.000 c/b: 1.000]
 Reduced Cell [RedCell a: 3.277 Å RedCell b: 3.277 Å RedCell c: 3.277 Å RedCell α : 60.00°
 RedCell β : 60.00° RedCell γ : 60.00° RedCell Vol: 24.89 Å³]

Crystal (Symmetry Allowed): Centrosymmetric

SG Symmetry Operators:

Seq	Operator	Seq	Operator	Seq	Operator	Seq	Operator	Seq	Operator	Seq	Operator
1	x,y,z	8	-x,-y,z	15	z,-x,-y	22	-y,x,z	29	-y,z,-x	36	z,-y,x
2	-x,-y,-z	9	y,x,z	16	-z,x,y	23	z,-y,-x	30	y,-z,x	37	-x,-y,z
3	z,x,y	10	-y,-x,-z	17	y,-z,-x	24	-z,y,x	31	-x,z,-y	38	x,y,-z
4	-z,-x,-y	11	z,y,x	18	-y,z,x	25	-x,y,-z	32	x,-z,y	39	-z,-x,y
5	y,z,x	12	-z,-y,-x	19	x,-z,-y	26	x,y,z	33	-y,-x,-z	40	z,x,-y
6	-y,-z,-x	13	x,y,-z	20	-x,z,y	27	-z,x,-y	34	y,-x,z	41	-y,-z,x
7	x,z,y	14	-x,y,z	21	y,-x,-z	28	z,-x,y	35	-z,y,-x	42	y,z,-x

Atomic Coordinates:

Atom	Num	Wyckoff	Symmetry	x	y	z	SOF	IDP	AET
N	1	4b	m-3m	0.5	0.5	0.5	0.5	6-a	
Zr	2	4a	m-3m	0.0	0.0	0.0	1.0	6-a	
C	3	4b	m-3m	0.5	0.5	0.5	0.5	6-a	

Subfile(s): Inorganic, Metals & Alloys Pearson Symbol: cF8,000 Prototype Structure [Formula Order]: Na Cl
 Prototype Structure [Alpha Order]: Cl Na LPF Prototype Structure [Formula Order]: Na Cl,cF8,225
 LPF Prototype Structure [Alpha Order]: Cl Na,cF8,225 ANX: NO

Cross-Ref PDF #'s: 01-077-3708 (Related Phase), ✓ 04-003-9694 (Alternate), ✓ 04-005-3675 (Alternate)
 Former PDF Numbers: 01-071-6065

References:

Type	DOI	Reference
Primary Reference		Calculated from LPF using POWD-12++.
Structure		"Über das pseudoternäre System 'ZrO'-ZrN-ZrC". Constant K., Kleffer R., Etmayer P., Monath. Chem. 106, 823 (1975).

Database Comments: ANX: NO. LPF Collection Code: 303358. Sample Preparation: Compound Preparation: powder metallurgical technique. Minor Warning: No e s d reported/abstracted on the cell dimension. No R factor reported/abstracted. LPF Editor Comment: editor deduced probable site occupation from nominal composition. Unit Cell Data Source: Powder Diffraction.

d-Spacings (11) - Zr C0.5 N0.5 - 04-001-6512 (Stick, Fixed Slit Intensity) - Cu K α 1 1.54056 Å

2θ (°)	d (Å)	I	h	k	l	2θ (°)	d (Å)	I	h	k	l	2θ (°)	d (Å)	I	h	k	l
33.4580	2.676020	999	1	1	1	70.2960	1.338010	124	2	2	2	109.0069	0.946115	96	4	2	2
38.8260	2.317590	810	2	0	0	83.3264	1.198750	50	4	0	0	119.4321	0.892006	80	5	1	1
56.0751	1.638720	444	2	2	0	92.8374	1.063340	96	3	3	1	140.1366	0.819360	38	4	4	0
66.8961	1.397510	305	3	1	1	96.0115	1.036420	128	4	2	0						

ANEXO IX

04-004-6798

Oct 6, 2017 8:55 AM (artursarabando)

Status Alternate QM: Indexed Pressure/Temperature: Ambient Chemical Formula: Zr
 Empirical Formula: Zr Weight %: Zr100.00 Atomic %: Zr100.00 Compound Name: Zirconium
 Entry Date: 09/01/2005 Last Modification Date: 09/01/2011 Last Modifications: Reflections

Radiation: CuK α 1 λ : 1.5406 Å d-Spacing: Calculated Intensity: Calculated - Peak λ/λ_c : 12.62
 λ/λ_c - CW ND: 0.47

SYS: Hexagonal SPGR: P63/mmc (194)
 Author's Cell [AuthCell a: 3.234 Å AuthCell c: 5.114 Å AuthCell Vol: 46.32 Å³ AuthCell Z: 2.00]
 Author's Cell MolVol: 23.16 Author's Cell Axial Ratio [c/a: 1.581]
 Density [Dcalc: 6.54 g/cm³ Dstruc: 6.54 g/cm³] SS/FOM: F(2 θ) = 966.6(0.0009, 29)
 Temp: 296.0 K (Ambient temperature assigned by ICDD editor)

Space Group: P63/mmc (194) Molecular Weight: 91.22 g/mol
 Crystal Data [XtlCell a: 3.234 Å XtlCell b: 3.234 Å XtlCell c: 5.114 Å XtlCell α : 90.00°
 XtlCell β : 90.00° XtlCell γ : 120.00° XtlCell Vol: 46.32 Å³ XtlCell Z: 2.00]
 Crystal Data Axial Ratio [c/a: 1.581 a/b: 1.000 c/b: 1.581]
 Reduced Cell [RedCell a: 3.234 Å RedCell b: 3.234 Å RedCell c: 5.114 Å RedCell α : 90.00°
 RedCell β : 90.00° RedCell γ : 120.00° RedCell Vol: 46.32 Å³]

Crystal (Symmetry Allowed): Centrosymmetric

SG Symmetry Operators:

Seq	Operator	Seq	Operator	Seq	Operator	Seq	Operator	Seq	Operator	Seq	Operator
1	x,y,z	5	-x,-y,-z	9	x,y,z	13	-x,-y,z+1/2	17	x,y,z+1/2	21	-x,-y,z+1/2
2	-x,-y,z	6	x,y,x-z	10	-x,-y,z	14	x,y,z+1/2	18	-x,-y,-z+1/2	22	x,x,y,-z+1/2
3	-y,x,y,z	7	-y,-x,z	11	-x,y,y,z	15	y,-x,y,z+1/2	19	y,x,z+1/2	23	x,y,y,z+1/2
4	y,-x,y,-z	8	y,x,-z	12	x,y,-y,-z	16	-y,-x,-z+1/2	20	-y,-x,-z+1/2	24	-x*y,y,-z+1/2

Atomic Coordinates:

Atom	Num	Wyckoff	Symmetry	x	y	z	SOF	IDP	AET
Zr	1	2c	-6m2	0.33333	0.66666	0.25	1.0	12-d	

Subfile(s): Common Phase, Explosive, Forensic, Inorganic, Metals & Alloys Pearson Symbol: hP2.00

Prototype Structure [Formula Order]: Mg Prototype Structure [Alpha Order]: Mg

LPF Prototype Structure [Formula Order]: Mg,hP2.194 LPF Prototype Structure [Alpha Order]: Mg,hP2.194

Cross-Ref PDF #s: 00-001-1147 (Deleted), 00-002-0821 (Deleted), 00-005-0665 (Primary), 01-071-4633 (Alternate),
 01-089-3045 (Alternate), 01-089-4791 (Alternate), 01-089-4902 (Alternate), 03-065-3366 (Alternate),
 04-001-0119 (Alternate), 04-002-3114 (Alternate), 04-002-4626 (Alternate), 04-002-9867
 (Alternate), 04-003-1384 (Alternate), 04-003-2042 (Alternate), 04-003-4129 (Alternate),
 04-003-5041 (Alternate), 04-003-5464 (Alternate), 04-003-5528 (Alternate), 04-003-6720
 (Alternate), 04-004-2989 (Alternate), 04-004-2990 (Alternate), 04-004-2996 (Alternate),
 04-004-4286 (Alternate), 04-004-5064 (Alternate), 04-004-6395 (Alternate), 04-004-7512
 (Alternate), 04-004-8479 (Alternate), 04-004-8950 (Alternate), 04-006-2780 (Alternate),
 04-006-2825 (Alternate), 04-007-4199 (Alternate), 04-008-1362 (Alternate), 04-008-1477
 (Primary), 04-012-6393 (Alternate), 04-013-0270 (Alternate), 04-013-9826 (Alternate),
 04-015-6227 (Alternate)

References:

Type	DOI	Reference
------	-----	-----------

Primary Reference Calculated from LPF using POWD-12++.

Structure "Transition Metal-Chalcogen Systems, VI: The Zirconium-Tellurium Phase Diagram", Sodeck H., Misker H., Komarek K.L. Monatsh. Chem. 110, 1 (1979).

Database Comments: LPF Collection Code: 532487. Sample Preparation: STARTING MATERIALS:Zr. Minor Warning: No
 e.s.d reported/abstracted on the cell dimension. No R factor reported/abstracted. Unit Cell Data
 Source: Powder Diffraction.

d-Spacings (2 θ) - Zr - 04-004-6798 (Stick, Fixed Slit Intensity) - Cu K α 1 1.54056 Å

2 θ (°)	d (Å)	I	h	k	l	*	2 θ (°)	d (Å)	I	h	k	l	*	2 θ (°)	d (Å)	I	h	k	l	*
31.9274	2.800730	248	1	0	0		74.0965	1.278500	18	0	0	4		109.3360	0.944185	9	2	0	4	
35.0646	2.557000	249	0	0	2		77.6798	1.228330	23	2	0	2		111.1945	0.933575	17	3	0	0	
36.5492	2.456470	999	1	0	1		82.9500	1.163050	18	1	0	4		117.8015	0.899288	47	2	1	3	
48.1469	1.888370	135	1	0	2		90.7726	1.082070	41	2	0	3		122.8902	0.879953	30	3	0	2	
56.8903	1.617000	149	1	1	0		93.3813	1.058570	13	2	1	0		129.3039	0.852333	5	0	0	6	
63.8737	1.456150	144	1	0	3		95.9694	1.036900	71	2	1	1		137.6865	0.825952	21	2	0	5	
66.7421	1.400360	20	2	0	0		100.3600	1.002890	42	1	1	4		141.7161	0.815362	20m	1	0	6	
68.6133	1.366980	146	1	1	2		103.9140	0.978073	19	2	1	2		141.7161	0.815362	m	2	1	4	
69.5433	1.350640	104	2	0	1		106.5964	0.960740	28	1	0	5		144.8248	0.808500	13	2	2	0	

ANEXO X

04-017-6803

Oct 6, 2017 9:00 AM (artursarabando)

Status: Alternate QM: Indexed Pressure/Temperature: Ambient Chemical Formula: TiN
 Empirical Formula: N Ti Weight %: N22.63 Ti77.37 Atomic %: N50.00 Ti50.00
 Compound Name: Titanium Nitride Entry Date: 09/01/2013

Radiation: CuK α λ : 1.5406 Å d-Spacing: Calculated Intensity: Calculated - Peak I/c: 4.1
 I/c - CW ND: 2.37

SYS: Cubic SPGR: Fm-3m (225)
 Author's Cell [AuthCell a: 4.295(5) Å AuthCell b: 4.295 Å AuthCell c: 4.295 Å AuthCell MolVol: 19.81
] Density [Dcalc: 5.19 g/cm³ Dstruc: 5.19 g/cm³] SS/FOM: F(10) = 999.9(0.0002, 10)
 Temp: 298.0 K (Ambient temperature assigned by ICDD editor)

Space Group: Fm-3m (225) Molecular Weight: 61.91 g/mol
 Crystal Data [XtiCell a: 4.295 Å XtiCell b: 4.295 Å XtiCell c: 4.295 Å XtiCell α : 90.00°
 XtiCell β : 90.00° XtiCell γ : 90.00° XtiCell Vol: 79.23 Å³ XtiCell Z: 4.00]
 Crystal Data Axial Ratio [a/b: 1.000 c/b: 1.000]
 Reduced Cell [RedCell a: 3.037 Å RedCell b: 3.037 Å RedCell c: 3.037 Å RedCell α : 60.00°
 RedCell β : 60.00° RedCell γ : 60.00° RedCell Vol: 19.81 Å³]

Crystal (Symmetry Allowed): Centrosymmetric

SG Symmetry Operators:

Seq	Operator	Seq	Operator	Seq	Operator	Seq	Operator	Seq	Operator	Seq	Operator	Seq	Operator
1	x,y,z	8	-x,-y,z	15	z,-x,-y	22	-y,x,z	29	-y,z,-x	36	z,-y,x	43	-x,-z,y
2	-x,-y,-z	9	y,x,z	16	-z,x,y	23	z,-y,-x	30	y,-z,x	37	-x,-y,z	44	x,z,-y
3	z,x,y	10	-y,-x,-z	17	y,-z,-x	24	-z,y,x	31	-x,z,-y	38	x,y,-z	45	-y,-x,z
4	-z,-x,-y	11	z,y,x	18	-y,z,x	25	-x,-y,-z	32	x,-z,y	39	-z,-x,y	46	y,x,-z
5	y,z,x	12	-x,-y,-x	19	x,-z,-y	26	x,-y,-z	33	-y,z,-x	40	z,x,-y	47	-x,-y,z
6	-y,-z,-x	13	x,-y,-z	20	-x,z,y	27	-z,x,y	34	y,-x,z	41	-y,-z,x	48	z,y,-x
7	x,z,y	14	-x,y,z	21	y,-x,-z	28	z,-x,y	35	-z,y,-x	42	y,z,-x		

Atomic Coordinates:

Atom	Num	Wyckoff	Symmetry	x	y	z	SOE	TOP	AET
Ti	1	4a	m-3m	0.0	0.0	0.0	1.0		
N	2	4b	m-3m	0.5	0.5	0.5	1.0		

Subfile(s): Inorganic, Metals & Alloys Pearson Symbol: cF8.00

LPF Prototype Structure [Formula Order]: Na Cl₂F8,225 LPF Prototype Structure [Alpha Order]: Cl Na₂cF8,225

Cross-Ref PDF #s:
 00-006-0642 (Deleted), 00-038-1420 (Primary), 01-071-9845 (Alternate), 01-074-8388 (Alternate),
 01-087-0628 (Alternate), 01-087-0629 (Alternate), 01-087-0631 (Alternate), 01-087-0632 (Alternate),
 03-065-0965 (Alternate), 04-001-2272 (Primary), 04-002-0166 (Alternate), 04-002-0575
 (Alternate), 04-002-2466 (Alternate), 04-002-5535 (Alternate), 04-002-6279 (Alternate),
 04-002-6734 (Alternate), 04-003-1280 (Alternate), 04-003-1310 (Alternate), 04-003-3285
 (Alternate), 04-003-3767 (Alternate), 04-003-4495 (Alternate), 04-003-7146 (Alternate),
 04-004-0779 (Alternate), 04-004-5181 (Alternate), 04-004-6867 (Alternate), 04-004-7193
 (Alternate), 04-004-8138 (Alternate), 04-007-4803 (Alternate), 04-008-0230 (Alternate),
 04-008-2407 (Alternate), 04-008-4976 (Alternate), 04-008-5127 (Alternate), 04-008-7173
 (Alternate), 04-009-8169 (Alternate), 04-013-0041 (Alternate), 04-013-7253 (Alternate),
 04-015-0336 (Alternate), 04-015-2441 (Alternate), 04-016-3219 (Alternate), 04-016-3390
 (Alternate), 04-016-4690 (Alternate)

References:

Type	DOI	Reference
Primary Reference		Calculated from LPF using POWD-12++.
Structure		"Influence of deposition conditions on texture development and mechanical properties of TiN coatings". Mayrhofer P.H., Geier M., Locker C., Chen L. Int. J. Mater. Res. 100, 1052 (2009).

LPF Collection Code: 1929908. Sample Preparation: STARTING MATERIALS: Ti,Ar (gas),N2 (gas).
 COMPOUND PREPARATION: deposited. Minor Warning: Minor warning from the LPF Editor exist.
 No R factors reported/abstracted. Magnitude of e.s.d. on cell dimension is >1000 ppm. LPF Editor
 Comment: editor deduced probable site occupation from nominal composition. Unit Cell Data Source:
 Powder Diffraction.

d-Spacings (10) - Ti N - 04-017-6803 (Stick, Fixed Slit Intensity) - Cu K α 1.54056 Å

2 θ (°)	d (Å)	I	h	k	l	+	2 θ (°)	d (Å)	I	h	k	l	+	2 θ (°)	d (Å)	I	h	k	l	+
36.1048	2.479720	898	1	1	1		76.8169	1.239860	117	2	2	2		122.9479	0.876713	97	4	2	2	
42.0391	2.147880	959	2	0	0		91.0761	1.073750	46	4	0	0		137.4646	0.826573	52	5	1	1	
60.9830	1.516510	458	2	2	0		102.8402	0.985341	57	3	3	1								
72.9989	1.294990	178	3	1	1		106.6523	0.960391	120	4	2	0								